

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/58713 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. November 1999 (18.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01471 (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Mai 1999 (10.05.99) (30) Prioritätsdaten: 198 22 108.8 12. Mai 1998 (12.05.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOIN- SIDE GMBH [DE/DE]; Warthestr. 21, D-14513 Teltow (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GERBLING, Klaus-Peter [DE/DE]; Peschkestrasse 3, D-12161 Berlin (DE). LAUTER, Frank-Roman [DE/DE]; Ritterstrasse 25A, D-14513 Teltow (DE). GROHMANN, Lutz [DE/DE]; Stubenrauchstrasse 21, D-12161 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: METHOD FOR DETECTING MICROORGANISMS IN PRODUCTS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DETEKTION VON MIKROORGANISMEN IN PRODUKTEN (57) Abstract The invention relates to a detection method and a test kit for economic detection of germs in pharmaceutical and cosmetic products. The invention uses specific probes and primers whose replication is made visible by means of a special indicator system, whereby a fluorescent colorant is released. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Detektionsverfahren und ein Testkit zur schnellen, ökonomischen Detektion von Keimen in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten. Dabei werden spezifische Sonden und Primer eingesetzt, deren Replikation durch ein spezielles Indikatorsystem sichtbar gemacht wird, wobei ein Fluoreszenz-Farbstoff freigesetzt wird.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur Detekti n von Mikroorganismen in Produkten

- Die Erfindung umfaßt Verfahren zum Nachweis mikrobieller Verunreinigungen nicht -
5 steriler Produkte, bevorzugt nach GMP - Richtlinien. Weiterhin umfaßt die Erfindung einen Testkit zum Nachweis mikrobieller Verunreinigungen und die Verwendung von Primersequenzen und Sondensequenzen zur Bestimmung von Mikroorganismen in Produkten, insbesondere in Arzneimitteln und Kosmetika einschließlich ihrer Ausgangsstoffe und Zwischenprodukte.
- 10 Das Verfahren dient zur quantitativen Identifizierung von Mikroorganismen durch Detektion spezifisch amplifizierter DNA-Sequenzen und soll als Ersatz entsprechender Methoden in der Europäischen Pharmakopöe, Abschnitt 2.6.12-13,1997 (EP) sowie weiteren nationalen Monographien wie zum Beispiel USP eingesetzt werden.
- 15 Die Herstellung von Arzneimitteln und Kosmetika nach GMP - Richtlinien beinhaltet chemische, physikalische und biologische Prüfungen zur Sicherstellung der Qualität. Bei Kosmetika muß der Hersteller dafür sorgen, daß von den Fertigprodukten keine Gesundheitsgefährdung ausgeht (EG Kosmetikverordnung, 76, 768 EWG (KOSVO), 6). Änderungsrichtlinie der EG KOSVO 93/35/EEC, 1993 und Forderungen des nationalen
20 Rechts in Deutschland (LMBG § 24).
Bei Arzneimitteln sind die mikrobiologischen Reinheitsanforderungen wesentlich präziser und decken die Anforderungen der KOSVO mit ab (EP Abschnitt 2.6.12-13,1997).
Die Anforderungen beinhalten zwei Gruppen:
- 25 (i) Die Zählung der gesamten lebensfähigen aeroben Bakterien und Pilze (Gruppe Gesamtkeimzahl) sowie
(ii) Den Abwesenheitsnachweis bestimmter Mikroorganismen: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, Salmonellen und Enterobactriaceae (Gruppe Leitkeime).

30

Stand der Technik

Keimzahlbestimmung mit Nährmedien

- Als Methoden zur Zählung der gesamten lebensfähigen aeroben Bakterien (Gruppe
35 Gesamtkeimzahl) werden in der EP konventionelle mikrobiologische Techniken beschrieben, die das Wachstum der nachzuweisenden Mikroorganismen in bestimmten

Flüssignährmedien oder auf Agarplatten beinhalten. Im Handel sind zahlreiche entsprechende Fertigprodukte oder deren Ausgangsstoffe erhältlich.

Die Anwendung der in der EP beschriebenen Methoden zur Bestimmung der aeroben Keime (Gruppe Gesamtkeimzahl) hat folgende Nachteile:

- 5 • Die Effizienz ist niedrig, da hoher Zeitbedarf bis zum Ergebniserhalt (3-5 Tage) besteht.
 - Die Ergebnisse sind unpräzise. Die Akzeptanzgrenzen dürfen um den Faktor 5 schwanken, EP, Abschnitt 2.6.12
 - Die Testmethoden sind schlecht und nur im geringen Maße automatisierbar.
 - 10 • Bedingt durch die Nährmedieneigenschaften können nur gut wachsende Mikroorganismen, nicht aber, wie gefordert, alle aeroben Mikroorganismen nachgewiesen werden.
 - Die Lagerhaltungskosten sind für Medien und Brutschränke hoch.
 - Bei Arzneimitteln mit bakteriostatischen Eigenschaften führt die Anwendung der EP - Methoden aufgrund der geringen Wiederfindung zugesetzter
 - 15 Testmikroorganismen teilweise zu nicht verwertbaren Ergebnissen.
 - Umfangreiche Plastikabfälle fallen an.
 - Die Energiekosten für Medienherstellung und Autoklavieren der anfallenden Abfälle sind hoch.
 - 20 • Die Fertilitätsprüfung aller Medienchargen ist sehr aufwendig insbesondere wegen kurzer Haltbarkeiten von Fertigmedien.
- Alternative Methoden zur Gesamtkeimzahlbestimmung im Handel sind: Geräte, die mittels Laserscan arbeiten wie z.B. CHEMSCAN (Chemunex):
- Diese Methode ist ungeeignet zum Nachweis von Mikroorganismen, die wie die
 - 25 Bakteriengattung *Sarcina* keine Einzelkolonien bilden.
 - Außerdem eignet sich diese Methode nicht für feste und ölige Prüfprodukte.

Nachweis spezieller Mikroorganismen durch unterschiedliche Kultureigenschaften und spezielle Stoffwechselprodukte

- 30 Als Methoden zur Bestimmung spezieller Keime (Gruppe Leitkeime) werden in der EP mikrobiologische Techniken beschrieben, die zur Grobdifferenzierung das Wachstum der jeweiligen Mikroorganismen in bestimmten selektiven Nährmedien oder auf Agarplatten beinhalten. Anschließend werden zur
- Feindifferenzierung spezifische Stoffwechselreaktionen der jeweiligen Mikroorganismen
- 35 wurde genutzt. Entsprechende Nachweissysteme, wie z.B. APILAB oder VITEK, sind weit verbreitet.

Die Anwendung der in der EP beschriebenen Methoden zur Bestimmung der speziellen Keime (Gruppe Leitkeime) hat die gleichen Nachteile, wie für die Anwendung der EP -

geforderten Methoden zur Bestimmung der aeroben Keime (siehe oben). Ein zusätzlicher Nachteil ist, daß die Selektivität der Nachweismethoden auf Stoffwechselunterschiede beschränkt ist und damit nur unzureichende Differenzierungen zuläßt.

5

Nachweis spezieller Mikroorganismen durch ATP- Gehaltsbestimmung nach Vorkultivierung

Alternative Methoden im Markt sind: Mikrobiologische Schnelltests, beruhend auf einem Vitalnachweis durch ATP - Bestimmung (z.B. Firma Millipore) nach Vermehrung der Mikroorganismen in Nährmedien.

Nachteil: Speziesbestimmungen sind nicht möglich und die Meßergebnisse unterliegen hohen Schwankungen in Abhängigkeit des Vitalitätszustands und sind für unterschiedliche Bakteriengattungen sehr verschieden.

Nachweis spezieller Mikroorganismen nach Vorkultivierung mittels DNA-Sonden, Primern und PCR

Weitere alternative Methoden im Handel sind unterschiedliche PCR - Applikationen, die aber, wie z.B. bei Chen et al. 1997, J. Food Microbiol. 35, 239-250 auf die Prüfung von Lebensmitteln ausgerichtet sind und eventuell nicht die strengen GMP - Anforderungen an die Qualitätsprüfung von Arzneimitteln erfüllen.

- Die vorhandenen PCR - Applikationen sind in der Regel anfällig für Kontaminationen durch PCR - Produkte, sind wenig reproduzierbar und schwer quantifizierbar. Darüber hinaus sind sie zeitaufwendig, da bei den alternativen PCR - Verfahren in der Regel mehrere Hybridisierungsschritte zur Detektion des PCR - Produktes notwendig sind.
- Diese Technologien sind in der Regel außerdem nur begrenzt automatisierbar und stör anfällig, da in der Regel zu mehreren Zeitpunkten der Applikation verschiedene Reagenzien zugegeben werden müssen.

Bei dem Verfahren gemäß der Patente US 4,800,159 und US 4,683,195 wird die zu amplifizierende Nukleinsäure, die einzelsträngig vorliegt oder einzelsträngig gemacht wird, mit einem molaren Überschuß zweier Oligonukleotidprimer unter Hybridisierungsbedingungen und in Gegenwart eines induzierenden Agens für die Polymerisation und Nukleotiden behandelt, wobei die Primer so gewählt werden, daß für jeden Strang ein zum Nukleinsäurenstrang komplementäres Verlängerungsprodukt des betreffenden Primers synthetisiert wird und daß ein Verlängerungsprodukt eines Primers, wenn es von seinem Komplement getrennt ist, als Matrize zur Synthese eines Verlängerungsproduktes des anderen Primers dienen kann. Nach Trennen der Verlängerungsprodukte von den Matrizen, an denen sie synthetisiert wurden, können

die gebildeten Verlängerungsprodukte zur erneuten Umsetzung mit den Primern verwendet werden. Durch die zyklische Wiederholung der Schritte ergibt sich eine theoretisch exponentielle Vermehrung einer Nukleinsäuresequenz, die innerhalb der äußeren Hybridisierungspositionen der Primer liegt.

5

Quantitativer Nachweis von Mikroorganismen - DNA durch eine spezielle Fluoreszenz - PCR - Technologie

Eine verfeinerte Methode ist das Verfahren gemäß Patent US 5,210,015 von Gelfand et al. Dabei wird eine Oligonukleotid-Sondenkonstruktion verwendet, die mit einem Teil
10 des Nukleinsäurestrangs der Matrize hybridisiert, wobei die Oligonukleotidsonde so ausgewählt wird, daß sie zwischen die Primerpaare (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) für die Amplifikation der diagnostischen Zielsequenz des jeweiligen Mikroorganismus paßt. Die Sondenkonstruktion und Synthese basiert auf der TaqMan - Technologie (Holland et al. 1993 und Lee et al. 1993, Nucl. Acids. Res, Vol 21, p 3761 - 3766).

15 Chemische Grundlage dieser neuen Methode ist der 1991 erstmalig publizierte 5'-Nuklease PCR - Assay (Holland et al. 1991, PNAS USA 88: 7276). Kernstück dieser Methode ist die 5'-Nuklease-Aktivität der TaqPolymerase und der Einsatz von fluoreszenzmarkierten, sequenzspezifischen Gensonden. Diese Gensonden sind am 5'-Ende mit einem Fluoreszein - Derivat (Reporter) und am 3'-Ende mit einem
20 Rhodaminderivat (Quencher) markiert. Durch die räumliche Nähe beider Farbstoffe wird die Fluoreszenzstrahlung des Reporters von dem Quencherfarbstoff absorbiert. Während der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden Reporter und Quencher durch die 5'-Nuklease-Aktivität der Taq - Polymerase räumlich voneinander getrennt. Die Fluoreszenzstrahlung des Reporters wird nicht mehr gequencht und kann direkt
25 gemessen und quantifiziert werden. Je mehr Sonden gespalten werden, desto höher ist die Fluoreszenz - Emission der Reportermoleküle. Die Menge an freigesetzter Emission ist der Menge der entstehenden PCR Produkte proportional und diese ist wiederum der Kopienzahl der in der PCR eingesetzten Gene proportional. Über die Genkopienzahl läßt sich die in der Analysenprobe vorhandene Organismenzahl berechnen. Die
30 Methode ist extrem sensitiv, da während der PCR Reaktion eine Genvermehrung und somit eine Signalamplifikation stattfindet. Da verschiedene Reporterfarbstoffe am Markt zur Verfügung stehen, können interne Kontrollen und Standards bei jeder Reaktion mitgeführt werden. Darüber hinaus kann eine Probe auf das Vorhandensein mehrerer Gene/Organismen gleichzeitig untersucht werden. Zur Zeit stehen im Handel drei
35 verschiedene Reporterfarbstoffe zur Verfügung.

Aufgabe und Lösung

Aufgabenschwerpunkt der vorliegenden Erfindung bildet die Entwicklung von Nachweisverfahren für Mikroorganismen, die erfahrungsgemäß häufig als Produktkontaminanten auftreten. Das sind insbesondere in Bezug auf die Gruppe der
5 Leitkeime: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, Salmonellen Arten, in Bezug auf die Gruppe Gesamtkeimzahl: die Bakterien und die Enterobacteriaceae.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Reagenzien,
10 Verfahren und die Verwendung von Substanzen, die den Nachweis mikrobieller Verunreinigungen nicht - steriler Produkte zum Beispiel entsprechend Anforderungen der EP einfacher, präziser und effizienter gestalten. Dabei sollen weniger Komponenten als zum Beispiel entsprechend Anforderungen der EP enthalten sein. Eine weitere Aufgabe ist es, sehr sensitive und quantitative Nachweise für die geforderten
15 Mikroorganismen zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Testkit zum Nachweis mikrobieller Verunreinigungen nicht steriler Produkte, insbesondere nach GMP - Richtlinien, auch Kosmetika und Lebensmittel, umfassend mindestens ein DNA-Fragment, das die folgenden SEQ ID
20 und Spacer (Abstandhalter) umfaßt:

- (a) einen Forward-Primer (SEQ ID Forward-Primer);
- (b) eine Sonde (SEQ ID Sonde);
- (c) einen Reverse-Primer (SEQ ID Reverse-Primer);
- (d) gegebenenfalls einen Spacer zwischen Forward-Primer und Sonde,
- 25 (e) gegebenenfalls einen Spacer zwischen Sonde und Reverse-Primer,
- (f) gegebenenfalls einen Spacer upstream des Forward-Primers
- (g) gegebenenfalls einen Spacer downstream des Reverse-Primers
 - wobei die SEQ ID [(SEQ ID Forward-Primer); (SEQ ID Sonde); und (SEQ ID Reverse-Primer)] auch Varianten umfassen, bei denen
30 eine, zwei oder drei Nukleotide substituiert, deletiert und / oder inseriert sind,

dabei hat die Variante im wesentlichen dieselbe Funktion wie die Sequenz der SEQ ID [(SEQ ID Forward-Primer); (SEQ ID Sonde); und (SEQ ID Reverse-Primer)].

35 bei Sonden die Funktion der Bindung an DNA und
bei Primern die Funktion der Bindung an DNA und die Bereitstellung eines verlängerbaren 3' Endes für die DNA - Polymerase;

- wobei die Spacer 0-40 Nukleotiden umfassen,

das DNA-Fragment genommen aus der Gruppe

- (i) für *Staphylococcus aureus*
5 SEQ. ID. NO. 6 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 7 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 8 als Reverse-Primer
- (ii) für *Pseudomonas aeruginosa*
10 SEQ. ID. NO. 9 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 10 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 11 als Reverse-Primer
- (iii) für *Escherichia coli*
15 SEQ. ID. NO. 12 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 13 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 14 als Reverse-Primer
- (iv) für *Salmonella ssp.*
SEQ. ID. NO. 15 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 16 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 17 als Reverse-Primer
- 20 (v) für Bakterien
SEQ. ID. NO. 18 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 19 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 20 als Reverse-Primer
- (vi) für Enterobacteriaceae
25 SEQ. ID. NO. 44 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 46 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 45 als Reverse-Primer
- (vii) für Enterobacteriaceae (16S rRNA)
30 SEQ. ID. NO. 47 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 48 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 49 als Reverse-Primer

oder weiterhin all die Sequenzen, welche komplementär zu den vorherigen Sequenzen SEQ ID NO 6 bis 49 sind.

- 35 Vorteilhaft ist eine Kombination aus zwei mehr bevorzugt aus drei noch mehr bevorzugt aus vier und am meisten bevorzugt aus fünf, sechs oder sieben Gesamtsequenzen.
Bevorzugt ist ein Kit mit PCR Reagenzien.
Mehr bevorzugt ist ein Kit mit PCR Reagenzien und TaqMan.

Alle genannten Sequenzen sind in dem Beispiel 24 aufgeführt. Für eine erfolgreiche TaqMan - PCR werden an die Primer- und Sondensequenzen (Beispiel 24) folgende Anforderungen gestellt:

5

- Primer sollten zwischen 15-30 Basen lang sein.
- Sondensequenz muß sich zwischen Primer - Sequenzen auf der zu amplifizierende DNS befinden.
- Sonde sollte zwischen gegebenenfalls 18-30 Basen lang sein.
- 10 • Sonde sollte einen GC - Gehalt von 40 - 60% besitzen.
- Der Tm der Sonde (Schmelzpunkt) sollte um 5 - 10 C° über dem Tm der Primer liegen
- Am 5' Ende der Sonde sollte sich kein G befinden.
- In der Sondensequenz sollte nie mehr als 3 mal dieselbe Base hintereinander
15 folgen.
- Keine Komplementarität zwischen Sonde und Primern oder innerhalb der Primer und keine auffälligen Sekundärstrukturen innerhalb der Sonde und der Primer.

20 Trotz dieser allgemeinen Richtlinien für das Design von Primern und Sonden (Livak et al. 1995, Guidelines for designing Taqman fluorogenic probes for the 5' Nuclease assays, Perkin Elmer Research News) muß die optimale Primer- und Sondenkombination für jede TaqMan - PCR - Anwendung neu experimentell bestimmt werden. Es konnte in einer Reihe von Beispielen (Beispiel 25) gezeigt werden, daß
25 obwohl oben genannten Richtlinien eingehalten wurden, kein optimales TaqMan PCR System entwickelt werden konnte. Auf der anderen Seite ist man durch die Sequenzcharakteristika der diagnostischen Zielsequenz des jeweiligen Organismus (z.B. hoher GC Gehalt, stark repetitive Sequenzen oder konservierte Sequenzbereiche) ggf. gezwungen, Primer- und Sondensequenzen auszuwählen, die nicht den oben
30 genannten Designrichtlinien entsprechen. Konsequenz dieser Einschränkungen zu den Richtlinien ist, daß zum Erreichen der notwendigen Spezifität und Sensitivität eines TaqMan - PCR - Tests die Auswahl der diagnostischen Zielsequenz aus dem Genom des zu detektierenden Mikroorganismus und die experimentelle Determinierung der optimalen Primer- und Sondensequenzen essentiell ist.

35

d.PCR - Reaktionsbedingungen einschließlich TaqMan Puffer:

Die Spezifität und Sensitivität eines TaqMan - PCR Tests wird neben den Primer- und Sondensequenzen (a - c) durch folgende Parameter bestimmt:

- (i) Höhe der Denaturierungstemperatur in den ersten PCR - Zyklen
- (ii) Höhe der Annealingtemperatur während der Amplifikationsphase der PCR
- (iii) Anzahl der PCR Zyklen
- 5 (iv) Einsatz von PCR - Additiven wie Glyzerin und / oder Formamid
- (v) Einsatz von 7-Deaza-2-deoxy-GTP neben GTP bei Genen mit hohem G/C Gehalt
- (vi) Höhe der Mg^{++} - Ionen - Konzentration im PCR - Puffer
- (vii) Konzentration der Primer und Sonde
- 10 (viii) Menge an Taq - DNA - Polymerase
- (ix) Abstand des cis - orientierten Primers zur Sonde

Alle diese Parameter wurden bei der Entwicklung hier aufgeführten TaqMan - PCR Tests experimentell berücksichtigt (Daten nicht gezeigt).

15

Beschreibung der Nukleinsäuren, die als diagnostische Zielsequenzen eingesetzt werden:

Unter den Nukleinsäuren, die zur Verwendung des Amplifikationsverfahren und Nachweisverfahrens für die oben genannten Zielorganismen verwendet werden können, werden insbesondere genomische Nukleinsäuren verstanden. Genomische Nukleinsäure- Sequenzen enthalten unter anderem auch die Gene bzw. Genfragmente, die für eine bestimmte Mikroorganismenart, -gattung, -familie oder -abteilung charakteristisch sind. Die Nukleinsäuresequenzen können in einen PCR - Test als diagnostische Zielsequenzen für einen spezifischen Nachweis dieser Art, Gattung, 25 Familie oder Abteilung eingesetzt werden.

Für den Nachweis der oben genannten Zielorganismen wurden folgende Zielsequenzen ausgewählt:

	Organismus/nen	Genbezeichnung
30	(i) <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>cap 8</i>
	(ii) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>alg Q</i>
	(iii) <i>Escherichia coli</i>	<i>mur A</i>
	(iv) <i>Salmonella ssp.</i>	<i>inv A</i>
35	(v) Bakterien	16S r RNA

Die Gene, aus denen die diagnostischen Zielsequenzen ausgewählt wurden, werden in den Beispielen detailliert beschrieben.

Definitionen:

Primerdefinition (inklusive deren Variationen): Unter einem Primer wird ein Molekül verstanden, das an einem polymeren Grundgerüst eine Anzahl von Nukleotiden aufweist. Die Sequenz der Nukleobasen wird so gewählt, daß sie zu aufeinanderfolgenden Basen der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz zu mehr als 80% komplementär sind. Dieses Molekül besitzt jeweils mindestens ein verlängerbares Ende. Unter Verlängerung wird insbesondere die enzymkatalysierte Ankopplung von Baseneinheiten unter Verwendung von Mononukleosid - Triphosphat - Einheiten oder Oligonukleotiden verstanden. Als Enzym wird bevorzugt eine DNA - Polymerase eingesetzt. Die Nukleinsäure, die Nukleotidsequenzen enthält, welche amplifiziert werden sollen, dient hierbei als Matrize für den spezifischen Einbau von Basen. Die Sequenz der Matrize bestimmt die Sequenz der an den Primer angehängten Basen. Als Primer werden Moleküle mit 15-30 Basen verwendet. Als verlängerbares Ende dient im Falle einer DNA - Polymerase bevorzugt das 3'-Ende. Besonders bevorzugt sind Primer, die vollständig homolog zu einer Teilsequenz der Zielnukleotidsequenzen SEQ. ID. NO.1-5 sind (Beispiel 24).

Sondendefinition (inklusive Variationen): Unter einer Sonde wird ein Molekül verstanden, das wie die Primer an einem polymeren Grundgerüst eine Anzahl von Nukleotiden aufweist. Dabei wird ein Sondenkonstruktionsverfahren gemäß Patent US 5,210,015, verwendet, das bereits oben beschrieben wurde. Die Nukleinsäuresonden der vorliegenden Erfindung sind 18-30 Nukleobasen lang. Spezifische Sequenzen erhält man durch Aussuchen einer mindestens 18 Basen langen Sequenz aus den jeweiligen Matrizen (SEQ. ID. NO. 1-5, Beispiel 24). Erfindungsgemäß sind daher Sonden bevorzugt, die zu mindestens 90% homolog zu einem Teil der jeweiligen Matrizen (SEQ. ID. NO. 1-5) sind. Besonders bevorzugt sind Sonden mit strenger Homologie.

Definition von Homologie: Gegenstand der Erfindung sind Nukleotidsequenzen, die zu mindestens 80%, bevorzugt zu 90 %, am meisten bevorzugt zu 95% komplementär sind zu den Ziel-Nukleotidsequenzen SEQ. ID. NO. 1 bis 5 und 46 und 48.

Die Homologie (in %) ergibt sich aus der Anzahl an identischen Purin- bzw. Pyrimidinbasen in einer gegebenen Nukleotidsequenz.

Definition von Hybridisieren: Hybridisieren liegt dann vor, wenn die folgenden Verfahrensschritte vorliegen, bevorzugt die folgenden Bedingungen.

Die erfindungsgemäßen Primer und Sonden binden an komplementäre Basen bevorzugt an komplementäre Nukleotidsequenzen im Erbgut der Zielorganismen aus

der Gruppe Gesamtkeimzahl und an komplementäre Nukleotidsequenzen im Erbgut der Zielorganismen aus der Gruppe Leitkeime.

Darüber hinaus binden sie bevorzugt nicht an Nukleinsäure - Sequenzen, die für andere Mikroorganismen spezifisch sind.

5

Definition von Arzneimittel: Diese Substanzen sind die in den Monographien der EP beschriebenen Wirkstoffe, Rohstoffe, Hilfsstoffe, und Zubereitungen, die zur Anwendung in der Humanmedizin und Veterinärmedizin bestimmt sind.

10 Definition von Kosmetika: Diese Substanzen sind nicht in den Monographien der Pharmakopöen beschrieben, sondern unterliegen den Richtlinien der KOSVO und des LMBG. Sie umfassen Rohstoffe, Hilfsstoffe und Zubereitungen, die zur Anwendung an Menschen und Tieren bestimmt sind.

15 Definition von Mikroorganismus: Dieser Begriff umfaßt in erster Linie Organismen, die im menschlichen und tierischen Körper Krankheiten hervorrufen können und nur mikroskopisch wahrnehmbar sind. Sie sind in der Regel einzellig bzw. treten in lockeren Verbänden gleichartiger Zellen auf und werden aufgrund ihrer einfachen zellulären Organisation als Protisten bezeichnet. Ihre morphologischen und kulturell-
20 biochemischen Merkmale, sowie ihre chemische Zusammensetzung, Antigen - Eigenschaften und genetischen Merkmale sind in der Literatur gut dokumentiert, z.B. in: Mikrobiologische Diagnostik, Burkhardt, 1992.

Definition von PCR-Reagenzien: PCR-Reagenzien sind Stoffe, die für eine PCR
25 Reaktion mit maximaler Sensitivität und Spezifität notwendig sind, insbesondere DNA-Polymerase, Mg^{2+} Ionen wie z. B. $MgCl_2$, Kaliumsalze wie z.B. KCl, Additive wie z.B. Glycerin oder DMSO oder Formamid, Primer und Sonden, Desoxynukleotide, Puffersubstanz wie z. B. Tris-Base sowie optionale Zusätze in Form von passiven Fluoreszenzreferenz-Verbindungen wie z.B. das Fluoreszenzfarbstoff-Derivat ROX und
30 z. B. 7-Deaza-2-deoxy-GTP als Ersatz von dGTP.

Definition von Komplementär: Komplementäre Strukturen entsprechen sich gegenseitig oder ergänzen sich. So sind zum Beispiel die Polynucleotid - Stränge der natürlichen DNA - Doppelhelix komplementär. Sie bilden zwei komplementäre Stränge aufgrund
35 der spezifischen Basen - Paarung (A-T beziehungsweise G-C). Dadurch ist die Nucleotid - Sequenz im anderen Strang eindeutig festgelegt, zwar nicht identisch, aber komplementär. Ähnliches gilt für DNA - RNA - Hybride (mit A-U anstelle von A - T - Paaren). cDNA hat eine zu einer mRNA komplementäre Struktur. Bevorzugt ist eine

- komplementäre Struktur, bei der (aa) die Sequenz des Forward-Primer und die Sequenz der Sonde oder (bb) die Sequenz der Sonde und des Reverse-Primers einer zuvor genannten Gruppe (i) bis (vii) alle beide komplementär zu den definierten Sequenzen sind. Mehr bevorzugt ist eine komplementäre Struktur, bei der die Sequenz des Forward-Primer, die Sequenz der Sonde und des Reverse-Primers einer zuvor genannten Gruppe (i) bis (vii) alle drei komplementär zu den definierten Sequenzen sind.

Verfahren

- Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Detektion von Mikroorganismen in Produkten, insbesondere Arzneimitteln oder Kosmetika, welches Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:
- a) Einsetzen von Primern und fluoreszenzmarkierten Sonden mit den entsprechenden Sequenzen und deren Variationen,
 - (i) für *Staphylococcus aureus*
SEQ. ID. NO. 6 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 7 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 8 als Reverse-Primer
 - (ii) für *Pseudomonas aeruginosa*
SEQ. ID. NO. 9 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 10 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 11 als Reverse-Primer
 - (iii) für *Escherichia coli*
SEQ. ID. NO. 12 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 13 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 14 als Reverse-Primer
 - (iv) für *Salmonella ssp.*
SEQ. ID. NO. 15 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 16 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 17 als Reverse-Primer
 - (v) für Bakterien
SEQ. ID. NO. 18 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 19 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 20 als Reverse-Primer
 - (vi) für Enterobacteriaceae
SEQ. ID. NO. 44 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 46 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 45 als Reverse-Primer

- (vii) für Enterobacteriaceae (16S rRNA)
SEQ. ID. NO. 47 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 48 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 49 als Reverse-Primer
- 5 oder weiterhin all die Sequenzen, welche komplementär zu den vorherigen Sequenzen SEQ ID NO 6 bis 49 sind,
- b) Vervielfältigen der DNA mit PCR; und
- c) Bestrahlung mit spezifischen Wellenlängen, die den Fluoreszenzfarbstoff anregen,
- 10 d) Messung und Quantifizierung der Emission des angeregten Fluoreszenzfarbstoffes.

Die Erfindung umfaßt ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die Herstellung der Sonden auf der TaqMan-Detektionstechnologie beruht.

15

Kern der Erfindung

Kern der Erfindung ist die Kombination bestimmter ausgewählter Sonden/Primer-Paare, die Mikroorganismen zufriedenstellend detektieren können. Die Optimierung der Sonden/Primer-Paare und der PCR Reaktionsbedingungen auf Sensitivität und Eignung zur GMP-konformen Produktprüfung nach EP, 2.6.12-13: Microbial contamination of products not required to comply with the test for sterility (1997) ist ebenfalls wesentlich. Dabei wird eine PCR-Technologie nach den US-Patenten US 4,800,159 und US 4,683,195 verwendet. Dabei findet insbesondere die TaqMan-Technologie Anwendung, die in dem US-Patent 5,210,015 beschrieben ist, welches am 11. Mai 1993 als Patent

20

25

herausgegeben worden ist.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren oder dem erfindungsgemäßen Testkit handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform der Fluoreszenz-PCR Technologie (TaqMan) für die oben genannten Zielmikroorganismen.

30

Vorteile:

Die erfindungsgemäßen Verfahren und die Testkits sind denen in der EP vorgeschriebenen Analysenmethoden in vielen Punkten weit überlegen (für Kosmetika wird z. Zt. noch keine vorgeschriebene Methode gefordert) und sollen diese, nach Validierung des Verfahrens mit dem jeweiligen Prüfprodukt, vollständig ersetzen. Die Möglichkeit, andere Analysenmethoden zu benutzen, wird in der EP (General Notices) explizit zugelassen, wenn sie die gleichen Ergebnisse wie die vorgeschriebenen Methoden ergeben.

35

Insbesondere hat das erfindungsgemäße Verfahren die folgenden Vorteile:

(A) Kit und Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen der Gruppe
Gesamtkeimzahl :

- 5 Erstmals können durch Anwendung dieses Kits und Verfahrens ohne vorhergehende Kultivierung alle kontaminierenden Bakterien, deren Sequenz in der NIH Datenbank, USA, Stand 11.1997, beschrieben sind, analytisch bestimmt werden. Dabei werden lebende und nicht-vermehrungsfähige Bakterien quantitativ und sehr präzise mit einer Sensitivität von 1-3 Bakterien im Prüfprodukt erfaßt. Konsequenz der Anwendung ist
- 10 eine deutliche erhöhte Produktsicherheit für den Verbraucher, da:
- Sporen und schwer kultivierbare Mikroorganismen, von denen eine Gesundheitsgefährdung ausgehen kann, erfaßt werden können,
 - Nicht-vermehrungsfähige Mikroorganismen, die schwer nachweisbare Toxine enthalten, ebenfalls erfaßt werden können,
 - 15 • Kontaminierende DNA bakterieller Herkunft , deren Abwesenheit zur Zeit schon in Biologicals und Produkten aus der rDNA-Technologie gezeigt werden muß, (EP,1997 und USP 1995) in allen Prüfprodukten einfach und effizient nachgewiesen werden kann.

Außerdem gibt es für die Anwendung keine besonderen Sicherheitsauflagen, da keine

20 Komponenten des Kits einer Gefahrstoffverordnung unterliegen.

(B) Alle beanspruchten Kits und Verfahren:

- Die Anwendung hat ökonomische Vorteile für Verbraucher und Hersteller, da die bisherigen Verfahren um mehrere Tage zeitaufwendiger sind und häufig den
- 25 zeitbestimmenden Schritt in der Freigabeanalytik darstellen. Schnelle Ergebnisse zur mikrobiologischen Sicherheit eines biologisch anfälligen Prüfprodukts führen zur Senkung der Kosten in Entwicklung und Produktion wie z.B. niedrigere Lagerhaltungskosten oder schnellerer Response auf variable Marktanfragen und damit insgesamt zur Senkung der Gestehungskosten, die in preiswertere Produkte
- 30 einmünden.
- Die Anwendung hat ökologische Vorteile, da die Reduktion von Analysenzeit und Analysenmaterial (Plastik und Medien) die erheblichen Energiekosten deutlich erniedrigt.

Beispiele:

Die nachfolgenden Beispiele beschreiben die entwickelten PCR-Schnelltests zur Detektion der Zielmikroorganismen, inklusive aller Sequenzvariationen und Targetsequenzen:

- | | | |
|----|---|-------------------|
| 5 | (i) <i>Staphylococcus aureus</i> | (Beispiele 1-5) |
| | (ii) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | (Beispiele 6-9) |
| | (iii) <i>Escherichia coli</i> | (Beispiele 10-13) |
| | (iv) <i>Salmonella ssp.</i> | (Beispiele 14-17) |
| 10 | (v) Bakterien | (Beispiele 18-23) |
| | (vi) Target-Sonden-und Primersequenzen | (Beispiel 24) |
| | (vii) Sequenzvariationen | (Beispiel 25) |
| 15 | (viii) (Entwicklungssequenzen Sonden und Primer mit nicht zufriedenstellender Testspezifität/Sensitivität | (Beispiel 26) |

Beispiel 1**DNA-Freisetzung nach Voranreicherung**

Je 100 µl-Aliquote der jeweiligen Mikroorganismen-Kultur wurde zur Freisetzung der DNS lysiert (Makino et al. Applied Environ. Microbiol. 3745-3747, 1995). Die DNS wurde von Proteinen und sonstigen PCR-Inhibitoren gereinigt und dann in PCR Amplifikationsexperimenten eingesetzt.

Beispiel 2**Nachweis von *Staphylococcus aureus***

Der Nachweis von *S. aureus* erfolgte durch erfindungsgemäße artspezifische Amplifikation von cap-8 Gensequenzen (SEQ. ID. NO. 1, siehe Beispiel 24). Das cap-8 Gencluster verschlüsselt Proteine, die bei der Biosynthese der Kapsel von *S. aureus* beteiligt sind. Die Kapsel umhüllt die Oberfläche dieser Bakterien und stellt einen Schutzmechanismus gegen die Abwehrmechanismen der Wirtsorganismen dar. Die molekulare Zusammensetzung der Kapsel ist für *S. aureus* spezifisch und stellt sozusagen einen molekularen Fingerabdruck dieser Staphylococcen-Art dar. Der (open reading frame O) ORF-O des cap-8 Genclusters ist in den verschiedenen Serotypen von *S. aureus* konserviert (Sau und Lee 1996, J. Bacteriol. 178, 2118-2126). Die DNA-Sequenzen aus dem ORF-O des cap-8 Genclusters (SEQ. ID. NO. 1) wurden als diagnostische DNA-Sequenzen zur Synthese von artspezifischen DNA-Primern und Sonden ausgewählt.

Als Resultat von DNA-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischen Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende cap-8 spezifische DNA-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

1. PCR-Sonde

20 mer 5'-TAMRA- CCT GGT CCA GGA GTA GGC GG 3' - FAM

(Sonde cap-8 # 15460*, als reverse complement einsetzen) [SEQ. ID. NO. 7] Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert worden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

2. PCR-Primer

24 mer: 5' -AGA TGC ACG TAC TGC TGA AAT GAG -3'

(Primer cap-8 forward # 15297*) [SEQ. ID. NO. 6]

26 mer: 5' -GTT TAG CTG TTG ATC CGT ACT TTA TT - 3'

(Primer cap-8 reverse # 15485* als reverse complement einsetzen) [SEQ. ID. NO. 8]

*Die Positionen beziehen sich auf die in der von Sau and Lee (1996, J. Bacteriol. 178, 2118-2126) publizierten cap-8 DNS Sequenz.

Synthese und Reinigung der PCR Primer Oligonukleotide erfolgte durch die Firma PE Applied Biosystems und nach deren Protokollen.

Beispiel 3**PCR-Bedingungen für den Nachweis von *Staphylococcus aureus***

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, und MgCl₂ Konzentration ergaben sich folgende Bedingungen als optimal:

Alle Komponenten wurden von der Firma PE Applied Biosystems, Weiterstadt, bezogen. Herstellung der TaqMan-PCR-Reaktionsgemische, Durchführung der PCR Reaktionen und Bedienung der PCR Heizblocks bzw. des Fluoreszenz-Detektors (PE ABD Modell 7700 oder Modell LS50B) erfolgte nach Anweisungen des Geräteherstellers (User's Manual, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, PE Applied Biosystems 1997, bzw. Users Manual, PE ABI LS50 B).

Folgende Komponenten wurden in einem PCR Reaktionsgefäß (PE Applied Biosystems Best. Nr. N8010580) gemischt:

Komponente	Volumen (μ l)	Endkonzentration (in 50 μ l)	Menge
DNA	5.00		1 fg - 100 ng
Bidest	10.25		
10 fach konzentrierter TaqMan Puffer A*	5.00	1 x	
25 mM MgCl ₂ Lösung	8.00	4 mM	
DATP	2.00	200 mM	
DCTP	2.00	200 μ M	
DGTP	2.00	200 μ M	
DUTP	2.00	400 μ M	
5' Primer # 15297	5.00		15 pmol
Sonde # 15460	3.00		6 pmol
3' Primer # 15485	5.00		15 pmol
Ampli Taq Gold*	0.25		1.25 units
AmpErase UNG*	0.50		0.50 units
Gesamtvolumen	50.00		

* (aus: TaqMan PCR Core Reagents, N 8080229, PE Applied Biosystems)

Für eine optimale Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist darauf zu achten, daß bei jedem PCR-Lauf möglichst viele Komponenten des PCR-Mixes in einem sogenannten Mastermix vorgemischt werden. Unter Standardbedingungen wird nur das zu untersuchende DNA-Material (0 -15.25 μ l) als Komponente in jedes PCR Reaktionsgefäß separat zugeben.

Die PCR-Reaktionen werden in dem PCR Heizblock des ABI Sequence Detectors 7700 durchgeführt. Funktional äquivalent sind PCR-Heizblöcke mit vergleichbaren Heiz- und Wärmetransfereigenschaften, wie z. B. die PE ABI Geräte Modell 7200, 9700, 9600 und 2400. Das PCR-Zyklusprofil ist wie folgt:

Cycle	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Wieder- holungen
Hold	50	2:00	1
Hold	95	10:00	1
Cycle	95	0:15	40
Cycle	60	1:00	
Hold	25	5:00	

Für detaillierte Erklärungen zum PCR-Zyklus-Profil siehe: User's Manual, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, PE Applied Biosystems 1997.

Beispiel 4

Selektivität des *S. aureus* PCR-Schnelltests

4.1 Elektrophoretische Analyse

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA aus verschiedenen Organismen isoliert und im PCR Test eingesetzt (Abb. 1, Sambrock et al. 1993). Die entstandenen PCR-Produkte wurden elektrophoretisch analysiert. Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 213 Basenpaaren. Kontrollsequenzierungen der PCR-Produkte verifizierten, daß es sich um *cap8-0* DNA handelte (ohne Abb.)

Die DNA (10 ng pro Spur, 2-14) aller eingesetzten *S. aureus* Stämme (Lane 2-5) wurde von den *cap8-0* Primern (# 15297 und # 15485) detektiert. Dem gegenüber wurde die DNA einer nahe verwandten *Staphylococcus* Art, *S. epidermidis* (Lane 6) und die anderer bakterieller Gattungen (Lane 7-11) nicht detektiert. DNA aus Pilz, Fisch und Mensch (Lane 12-14) wurden als Kontrollen eingesetzt und ergaben kein Detektionssignal. NTC (= no template control) ist die Wasserkontrolle, in der keine DNA eingesetzt wurde.

4.2 Fluoreszenzanalyse

Neben der elektrophoretischen Analyse wurde die Selektivität der diagnostischen PCR als TaqMan-Fluoreszenztest unter Verwendung der oben genannten Primer und Fluoreszenzsonde bestimmt. Die Resultate sind als C_t -Werte (Threshold cycle) angegeben.

C_t -Wert: Die bei der TaqMan-PCR stattfindende Hydrolyse der Fluoreszenzsonde führt zu einem Anstieg der Reporterfluoreszenzstrahlung von einem PCR-Zyklus zum Nächsten. Die Zyklenzahl, bei der erstmals die Reporterfluoreszenzstrahlung über der Hintergrundstrahlung (NTC) des Systems liegt und linear ansteigt, wird "Threshold cycle" (C_t) genannt. (Hintergrundstrahlung (NTC) ist die Reporterfluoreszenzstrahlung in PCR Kontrollreaktionen, in denen keine Template-DNA eingesetzt wurde.) Sowohl die Menge an freiwerdender Reporterstrahlung als auch der "Threshold cycle" (C_t -Schwellenwert-Zykluszahl) sind proportional zu der Menge an entstehenden PCR Produkten und somit zu der Menge an eingesetzten Genkopien (Keimzahl).

Je mehr Genkopien eingesetzt werden, desto niedriger ist der resultierende C_t -Wert. In einem PCR - System mit 100%iger Effizienz nimmt der C_t -Wert mit jeder Verdopplung der Start-Genkopienzahl um einen Zyklus ab. Bei einer PCR-Reaktion die z.B. 40 Zyklen umfaßt, und bei der kein PCR Produkt entsteht, wird der C_t -Wert per Definition 40 sein.

Es werden je 10 ng an Template-DNA in den PCR-Reaktionen für den Spezifitätstest eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen sind in Beispiel 3 angegeben.

Liste der g testeten DNA-Isolate

(je 10 ng genomische DNS analysiert)

5	Organismus	Resultat (als CT-Wert)
	<i>Staphylococcus aureus</i> Arten	
	<i>S. aureus</i>	
	DSM 683 (ATCC 9144)	17
10	DSM 1104 (ATCC 25923)	17
	DSM 6148	17
	DSM 346 (ATCC 6538)	17
	<i>S. epidermidis</i>	
	DSM 1798 (ATCC 12228)	40
15	Andere bakterielle Gattungen	
	Organismus	Resultat (als CT-Wert)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
20	DSM 1117 (ATCC 27853)	40
	DSM 1128 (ATCC 9027)	40
	DSM 3227 (ATCC 19429)	40
	DSM 50071 (ATCC 10145)	40
	<i>Salmonella typhimurium</i>	
25	DSM 5569 (ATCC 13311)	40
	<i>Streptococcus faecalis</i>	
	DSM 2981 (ATCC 14506)	40
	(reclassified DSM 2570 (ATCC 29212)	40
30	as <i>Enterococcus faecalis</i>)	
	DSM 6134	40
	<i>Escherichia coli</i>	
	DSM 787 (ATCC 11229)	40
35	DSM 1576 (ATCC 8739)	40
	Eukaryonten	
	<i>Neurospora crassa</i>	40
40	Mensch (Perkin Elmer ABI, 401846)	40
	Salmon (Sigma D 9156)	40
	Wasser	40

- 45 Nach etwa 17 Zyklen wurde erstmals ein linearer Anstieg der FAM-Fluoreszenz über der FAM-Hintergrundstrahlung der Fluoreszenzsonde detektiert, wenn *S. aureus* genomische DNA in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt wurde. Wurde DNS von *S. epidermidis* in der PCR angesetzt, einer nahe verwandten Art von *S. aureus* innerhalb der Gattung *Staphylococcus*, so ließ sich kein signifikanter Anstieg der FAM-
- 50 Reporterfluoreszenz detektieren.

Die Ergebnisse der PCR-Analyse mit DNA aus verschiedenen bakteriellen Gattungen, *Staphylococcus*-Arten und *Staphylococcus aureus* Stämmen zeigt die Spezifität des entwickelten *S. aureus* Tests. Nur *S. aureus* DNS wurde von den *cap-8* Primern und Sonden detektiert.

5

Beispiel 5

Sensitivität des *S. aureus* Nachweisverfahrens

Um die Sensitivität des *S. aureus* PCR-Tests zu bestimmen, wurde genomische *S. aureus* DNA präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt.

10

10 fg genomische *S. aureus* DNA entsprechen 3 Genomen (Strauss and Falkow 1997, *Science* 276, 707-712).

15

10	fg	=	3 KBE
10	pg	=	3.000 KBE
10	ng	=	3.000.000 KBE

20

Verschiedene Mengen an *S. aureus* DNA (1 fg bis 100 ng) wurden in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt (Abb. 2). Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte aus 6 unabhängigen Experimenten dar. Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz und somit an entstehenden PCR-Produkten wurde als CT-Wert angegeben.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNA von 3 Bakterienzellen mittels Fluoreszenz-PCR nachweisen läßt. Der PCR-Schnelltest erlaubt eine lineare Quantifizierung der eingesetzten *S. aureus* Genome über 5 log Stufen, d. h. zwischen 3 und 300.000 KBE (1ng DNS).

25

Beispiel 6

Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*

Der Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* erfolgte durch erfindungsgemäße artspezifische Amplifikation von *algQ*-Gensequenzen (Sequenzen s. Beispiel 24). Das *algQ*-Gen verschlüsselt Elemente eines Schutzmechanismus der von *Pseudomonas aeruginosa* im Laufe der Evolution entwickelt wurde, und der für diese Bakterienart spezifisch ist.

Die Produktion von Alginat ist eine einzigartige Virulenzeigenschaft von *Pseudomonas aeruginosa*. Alginat ist ein Polymer aus Mannuron- und Guluronsäure (1,4 glykosidisch verknüpft). Dieses Polymer bildet eine viskoses Gel auf der Bakterienoberfläche. Die Produktion dieses Biogels ist sehr sensitiv reguliert. Die Fähigkeit, Alginat zu synthetisieren, ist bei allen *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen vorhanden. Sie ist charakteristisch für diese Bakterienart. Alginat-Synthese ist ein energiekonsumierender

35

Prozeß und deshalb reguliert. Ein Gen, das Alginat-Synthese reguliert, ist das *algQ* - Gen (Konyecsni and Deretic 1990, J. Bacteriol. 172, 2511-2520). Es verschlüsselt die sensorische Komponente eines Signaltransduktions-Systems (Roychoudhury et al. 1993, PNAS USA 90: 965-969). Da das *algQ*- Gen an der Regulation eines spezifischen Schutzmechanismus beteiligt ist, stellt es einen genetischen Marker mit diagnostischer Potenz zur Identifizierung der Art *Pseudomonas aeruginosa* dar.

Als Resultat von DNA-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischen Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende *algQ*-spezifische DNA-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

1. PCR-Sonde :

26 mer: 5'-FAM - CCA ACG CCG AAG AAC TCC AGC ATT TC - TAMRA

(Sonde *algQ* # 911): [SEQ. ID. NO. 10]

Die Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert worden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

2. PCR-Primer:

23 mer: 5'-CTT CGA TGC CCT GAG CGG TAT TC-3'

(Primer *algQ* forward # 876*) [SEQ. ID. NO. 9]

Reverse Primer Sequence (# 1147):

23 mer: 5'-CTG AAG GTC CTG CGG CAA CAG TT-3'

(Primer *algQ* reverse # 1147* als reverse complement einsetzen) SEQ. ID. NO. 11

* Positionen beziehen sich auf die in Konyecsni and Deretic 1990, J. Bacteriol. 172, 2511-2520 publizierte DNA-Sequenz.

Synthese und Reinigung der PCR Primer Oligonukleotide erfolgte durch die Firma PE Applied Biosystems und nach deren Protokollen.

Beispiel 7**PCR-Bedingungen für den Nachweis von *P. aeruginosa***

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, und MgCl₂ Konzentration ergaben sich folgende Bedingungen als optimal:

	Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration (in 50 µl)	Menge DNA
		5.00		1 fg - 100 ng
10	Bidest	7.25		
	10 x TaqMan Puffer A	5.00	1 x	
	25 mM MgCl ₂ Lösung	13.00	6.5 mM	
	dATP	2.00	200 µM	
	dCTP	2.00	200 µM	
15	dGTP	2.00	200 µM	
	dUTP	2.00	400 µM	
	5' Primer # 876	1.00		3 pmol
	Sonde # 911	4.00		8 pmol
	3' Primer # 1147	5.00		15 pmol
20	AmpliTaq Gold	0.25		1.25 units
	AmpErase UNG	0.50		0.50 units
	DMSO	1.00		

		50.00		

25

Für eine optimale Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist darauf zu achten, daß bei jedem PCR-Lauf möglichst viele Komponenten des PCR-Mixes in einem sogenannten Mastermix vorgemischt werden. Unter Standardbedingungen wird nur das zu untersuchende DNA-Material (0-15.25 µl) als Komponente in jedes PCR Reaktionsgefäß separat zugeben.

30

Die PCR-Reaktionen werden in dem PCR Heizblock des ABI Sequence Detectors 7700 durchgeführt. Funktional äquivalent sind PCR-Heizblöcke mit vergleichbaren Heiz- und Wärmetransfereigenschaften, wie z. B. die PE ABI Geräte Modell 7200, 9700, 9600 und 2400.

35

Das PCR-Zyklusprofil für die *Pseudomonas aeruginosa* PCR ist wie folgt:

	Cycle	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Wiederholungen
40	Hold	50	2:00	1
	Hold	95	10:00	1
	Cycle	97	0:30	4
		60	1:00	
	Cycle	94	0:30	41
45		60	1:00	
	Hold	25	5:00	

für Details zu PCR-Bedingungen siehe Beispiel 3.

Beispiel 8

Selektivität des *Pseudomonas aeruginosa* PCR-Schnelltests

5

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA aus verschiedenen Organismen isoliert und im Fluoreszenz-PCR Test eingesetzt. Die Menge an entstandenen PCR Produkten wurde als CT-Wert (Threshold Cycle, für C_t -Wert s. Definition Beispiel 4) angegeben.

10

Liste der getesteten DNA-Isolate (je 10 ng genomische DNS analysiert)

15	Organismus	Resultat (als C_t -Wert)
	<i>Pseudomonas</i> Arten	
	<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117 (ATCC 27853)	19
	DSM 1128 (ATCC 9027)	19
	DSM 3227 (ATCC 19429)	19
20	DSM 50071 (ATCC 10145)	19
	<i>P. putida</i> DSM 50026	45
	<i>P. fluoreszenz</i> ATCC 948	45
	Andere bakterielle Arten	
25	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 683	45
	DSM 1104	45
	DSM 6148	45
	DSM 6538P	45
	<i>Streptococcus faecalis</i> DSM 2981	45
30	DSM 6134	45
	ATCC 29212	45
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	45
	<i>Escherichia coli</i> DSM 301	45
	DSM 787	45
35	DSM 1103	45
	ATCC 8739	45
	Eukaryonten	
	<i>Neurospora crassa</i>	45
40	<i>Arabidopsis thaliana</i>	45
	Salmon (Sigma D9156)	45
	Mensch (Perkin Elmer ABI, 401846)	45
	Wasser	45
45		

Ausschließlich *Pseudomonas aeruginosa* Stämme ergaben ein positives Ergebnis im PCR-Schnelltest. Nach 19 PCR Zyklen ($CT=19$) war erstmals ein linearer Anstieg der Fluoreszenz meßbar, wenn 10 ng *P. aeruginosa* DNS eingesetzt wurden. Der PCR Test

war hochspezifisch. Auch die nahe verwandten Arten *P. putida* und *P. fluoreszenz* ergaben kein Fluoreszenzsignal im PCR-Schnelltest.

Als Positivkontrolle wurden die selben bakteriellen DNS, die im algQ-PCR-Test analysiert worden waren mit dem universellen 16S rRNA PCR System (s. Beispiel 19)
5 untersucht. Alle bakteriellen DNS ergaben ein positives Signal mit dem 16S rRNA System. Das bedeutet, alle DNS ließen sich 16S rRNA-PCR-amplifizieren, aber lediglich die *P. aeruginosa* DNS ließen sich algQ-PCR-amplifizieren.

Das algQ-System ist *Pseudomonas aeruginosa* spezifisch.

Zusätzlich wurden die entstandenen PCR-Produkte elektrophoretisch analysiert (vgl.
10 Beispiel 3). Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 294 Basenpaaren (ohne Abb.). Kontrollsequenzierungen der PCR-Produkte verifizierten, daß es sich um algQ DNS handelte (ohne Abb.)

Beispiel 9

15 Sensitivität und Linearität des *P. aeruginosa* PCR-Schnelltests

Um die Sensitivität des *P. aeruginosa* PCR-Tests zu bestimmen, wurde genomische *P. aeruginosa* DNS präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt (Abb.3). Verschiedene Mengen an *P. aeruginosa* Genomkopien wurden in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt (Abb. 3). Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte und
20 Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten dar. Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz und somit an entstehenden PCR-Produkten wird als CT-Wert angegeben. Die PCR- Reaktion wurde über 45 Zyklen durchgeführt. Der CT-Wert der Wasserkontrolle (NTC = no template control) betrug 45.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNS von 3 Bakterienzellen mittels Fluoreszenz-PCR
25 nachweisen läßt. Der PCR-Schnelltest erlaubt eine lineare Quantifizierung der eingesetzten *P. aeruginosa* Genome über 4 log Stufen, d. h. zwischen 3 und 30.000 KBE.

Beispiel 10

30 Nachweis von *Escherichia coli*

Der Nachweis von *E. coli* erfolgte durch erfindungsgemäße artspezifische Amplifikation von *murA*-Gensequenzen

Spezifische Bereiche des *murA*-Gens dienten als diagnostisches Ziel für die Entwicklung eines PCR-Schnelltests zum Nachweis von *Escherichia coli*. Warum wurde
35 dieses Gen als diagnostisches Ziel gewählt? Das *murA* Gen verschlüsselt das Enzym UDP-N-Acetylglucosamin Enolpyruvyltransferase, ein wichtiges Strukturgen von *E. coli* (Marquardt et al. 1992, J. Bacteriol. 174, 5748-5752). Dieses Enzym katalysiert den ersten Schritt der Peptidoglykan-Synthese, im Falle von *E. coli* des Mureins, welches

einen essentiellen Bestandteil der bakteriellen Zellwand darstellt. Die Zellwandkomposition ist als ein charakteristisches Merkmal von Bakterienarten anzusehen. Es wurde die *murA* Nukleotidsequenz von *E. coli* mit der nahe verwandten Enterobacteriaceaeen-Art *Enterobacter cloacae* verglichen. Auf Grund der identifizierten Sequenzunterschiede wurde das *murA*-Gen als genetischer Marker mit diagnostischer Potenz zur Identifizierung der Enterobacteriaceaeen-Art *Escherichia coli* ausgewählt.

Als Resultat von DNS-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischer Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende *murA*-spezifische DNA-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

Forward Primer Sequence (# 767*):

5' GTT CTG TGC ATA TTG ATG CCC GCG 3' [SEQ. ID. NO. 12]

Sonde (# 802):

5'-FAM - TCT GCG CAC CTT ACG ATC TGG TT - TAMRA 3' [SEQ. ID. NO. 13]

Reverse Primer Sequence (# 884):

5' GCA AGT TTC ACT ACC TGG CGG TTG 3'

(als reverse complement einsetzen) [SEQ. ID. NO. 14]

* Positionen beziehen sich auf die in Marquardt et al. 1992, J. Bacteriol. 174, 5748-5752 publizierte DNA-Sequenz (Genbank: M92358).

Die Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert worden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

Beispiel 11

PCR-Bedingungen für den Nachweis von *Escherichia coli*

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, der $MgCl_2$ bzw. Glycerin Konzentration und der Nukleotidkomposition ergaben sich folgende Bedingungen als optimal:

25

	Komponente	Volumen (μ l)	Endkonzentration (in 50 μ l)	Menge
5	DNA	5.00		1 fg - 100 ng
	Bidest	8.75		
	10 x TaqMan Puffer A	5.00	1 x	
	25 mM MgCl ₂ Lösung	7.00	3.5 mM	
	dATP	2.00	200 μ M	
10	dCTP	2.00	200 μ M	
	7-deaza-dGTP	2.00	200 μ M	
	dUTP	2.00	400 μ M	
	Glycerin 40%	2.50	2%	
	5' Primer # 767	5.00		15 pmol
15	Sonde # 802	3.00		6 pmol
	3' Primer # 884	5.00		15 pmol
	AmpliTaq Gold	0.25		1.25 units
	AmpErase UNG	0.50		0.50 units
20		-----		
		50.00		

Das PCR-Zyklusprofil für die *Escherichia coli* PCR:

25

Cycle	Temperatur (C°)	Zeit (min)	Wiederholung
Hold	50	2:00	1
Hold	95	10:00	1
Cycle	95	0:15	40
	60	1:00	
Hold	25	5:00	

Für Details siehe Beispiel 3.

30

Beispiel 12

Selektivität des *Escherichia coli* PCR-Schnelltests

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA aus verschiedenen Organismen isoliert und im Fluoreszenz-PCR Test eingesetzt. Die

35 Menge an entstandenen PCR Produkten wurde als CT-Wert (Threshold Cycle) angegeben (Tab.).

Liste der getesteten DNA-Isolate
(je 10 ng genomische DNS analysiert)

	Organismus	Resultat (als CT-Wert)
5	Escherichia coli Stämme	
	Escherichia coli	
	DSM 301	16
	DSM 787	16
10	DSM 1103	16
	ATCC 8739	16
	Andere Enterobacteriaceae	
	Acetobacter pasteurianus	DSM 3509 40
15	Acinetobacter calcoaceticus	DSM 6962 40
	Aeromonas enteropelogenes	DSM 6394 40
	Alcaligenes faecalis	DSM 30030 40
	Budvicia aquatica	DSM 5075 40
	Buttiauxella agrestis	DSM 4586 40
20	Cedecea davisae	DSM 4568 40
	Chromobacterium violaceum	DSM 30191 40
	Enterobacter cloacae	DSM 30054 40
	Edwardsiella tarda	DSM 30052 40
	Ewingella americana	DSM 4580 40
25	Erwinia amylovora	DSM 30165 40
	Hafnia alvei	DSM 30163 40
	Haemophilus influenzae	DSM 4690 40
	Halomonas elongata	DSM 2581 40
	Helicobacter pylori	DSM 4867 40
30	Kluyvera ascorbata	DSM 4611 40
	Leclercia adecarboxylata	DSM 5077 40
	Legionella pneumophila	DSM 7515 40
	Leminorella grimaldi	DSM 5078 40
	Levinea malonatica	DSM 4596 40
35	Listeria monocytogenes	DSM 20600 40
	Moellerella wisconsensis	DSM 5076 40
	Morganella morganii sp.	DSM 30164 40
	Pantoea agglomerans	DSM 3493 40
	Photobacterium luminescens	DSM 3368 40
40	Plesiomonas shigelloides	DSM 8224 40
	Pragia fontium	DSM 5563 40
	Providencia stuarti	DSM 4539 40
	Proteus mirabilis	DSM 788 40
	Rhanella aquatilis	DSM 4594 40
45	Serratia marcescens	DSM 30121 40
	Tatumella typhosa	DSM 5000 40
	Vibrio proteolyticus	DSM 30189 40
	Xenorhabdus nematophilus	DSM 3370 40
	Yersinia enterocolitica	DSM 4780 40
50	Andere bakterielle Arten	
	Pseudomonas aeruginosa	DSM 1128 (ATCC 9027) 40
	Bacillus subtilis	40

	Salmonella typhimurium	ATCC 13311	40
	Pseudomonas mirabelis	DSM 788	40
	Staphylococcus aureus	DSM 6538P	40
	Streptococcus faecalis	DSM 2981	40
5	Klebsiella pneumonia	ATCC 10031	40
	Citrobacter freundii	DSM 30040	40

Eukaryonten

	Neurospora crassa	40
10	Arabidopsis thaliana	40
	Salmon (Sigma D9156)	40
	Mensch (Perkin Elmer ABD, 401846)	40

Wasser

40

15

Lediglich *Escherichia coli* Stämme ergaben ein positives Ergebnis im PCR-Schnelltest. Nach 16 PCR Zyklen (CT=16) war erstmals ein linearer Anstieg der Fluoreszenz meßbar, wenn 10 ng *Escherichia coli* DNS eingesetzt wurden. Der PCR Test war hochspezifisch. Auch ein nahe verwandte Enterobacteriaceaeen-Art, *Enterobacter*

20

cloacae, ergab kein Fluoreszenzsignal im PCR-Schnelltest (Tab.). Als Positivkontrolle wurden dieselben bakteriellen DNS, die im *murA*-PCR-Test analysiert worden waren (Tab.) mit dem universellen 16S rRNA PCR System (s. Beispiel 19) untersucht. Alle bakteriellen DNS ergaben ein positives Signal mit dem 16S rRNA System. D. h. alle DNS ließen sich 16S rRNA-PCR-amplifizieren, aber lediglich

25

die *Escherichia coli* DNS ließen sich *murA*-PCR-amplifizieren. Das *murA*-System ist spezifisch für *Escherichia coli*. Zusätzlich wurden die entstandenen PCR-Produkte elektrophoretisch analysiert (vgl. Bericht *Staphylococcus aureus*). Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 142 Basenpaaren (ohne Abb.). Kontrollsequenzierungen der PCR-Produkte verifizierten,

30

daß es sich um *murA* DNS handelte (ohne Abb.)

Beispiel 13**Sensitivität des *E. coli* Test**

35 Um die Sensitivität des *Escherichia coli* PCR-Tests zu bestimmen, wurde genomische *Escherichia coli* DNS präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt (Abb. 4).

Verschiedene Mengen an *Escherichia coli* Genomkopien wurden in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt (Abb. 4). Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten dar. Die Menge an

40 freiwerdender Fluoreszenz und somit an entstehenden PCR-Produkten wird als CT angegeben. Die PCR Reaktion wurde über 40 Zyklen durchgeführt. Der CT-Wert der Wasserkontrolle (NTC = no template control) betrug 40.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNS von 3 Bakterienzellen mittels Fluoreszenz-PCR nachweisen läßt. Der PCR-Schnelltest erlaubt eine lineare Quantifizierung der eingesetzten *Escherichia coli*-Genome über 6 log Stufen, d. h. zwischen 3 und 3.000000 KBE.

5

Beispiel 14

Nachweis von *Salmonella* spp. (Subspezies)

Der Nachweis von *Salmonella* spp. der Art *Salmonella enterica* erfolgte durch erfindungsgemäße spezifische Amplifikation von *invA*-Gensequenzen

10

Spezifische Bereiche des *invA* Gens dienen als diagnostisches Ziel für die Entwicklung eines PCR-Schnelltests zum Nachweis von *Salmonella* spp. Warum wurde dieses Gen als diagnostisches Ziel gewählt? Das *invA* Gen verschlüsselt einen *Salmonella*-spezifischen Virulenzfaktor. Verschiedene Untersuchungen an einer Reihe von *Salmonellen* haben gezeigt, daß diese Bakterienarten an Epithelzellen binden. Bei diesem Prozeß wird das Actin-System der Wirtszellen von den Bakterien beeinflusst. Als Reaktion umschließen die Wirtszellen die Bakterienzellen. Nach vollständigem Einschluß existieren die Bakterien in Vesikeln im Zytoplasma der Wirtszellen. An diesem Einschließungsprozeß (engl. invasion) sind die sogenannten *inv* Gene (*invA-H*) von *Salmonella* beteiligt. Mutanten in dem *invA* Gen binden noch an Wirtszellen, werden von diesen aber nicht mehr aufgenommen. Die *inv* Gensequenz *Salmonella* Subspezies stark konserviert erhalten (Salyers and Whitt 1994, *Salmonella* Infection, in: Bacterial Pathogenesis ASM Press, Washington D.C. p233). Das *invA* Gen von *Salmonella* wurde isoliert und die Nukleotidsequenz aufgeklärt (Galan and Curtis 1989, PNAS USA 86: 6383-7, Galan and Curtis 1991, *Infection and Immunity* 59: 2901-2908, und siehe: Rahn et al. 1992, *Mol. Cell. Probes* 6: 271-279). Da das *invA* Gen an der Expression eines spezifischen Virulenzmechanismus von *Salmonellen* beteiligt ist, stellt es einen genetischen Marker mit diagnostischer Potenz zur Identifizierung von *Salmonella* spp. dar (Rahn et al. 1992, *Mol. Cell. Probes* 6: 271-279).

30

Als Resultat von DNS-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischer Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende *invA*-spezifische DNA-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

35 Forward Primer Sequence (# 269*):

5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC 3'

[SEQ. ID. NO. 15]

Sonde (# 333):

5'-FAM - CTT CTC TAT TGT CAC CGT GGT CCA - TAMRA 3' [SEQ. ID. NO. 16]

Reverse Primer Sequence (# 542):

- 5 5' GGT TCC TTT GAC GGT GCG ATG AAG 3' (als reverse complement einsetzen)
[SEQ. ID. NO. 17]

* Positionen beziehen sich auf die in Boyd et al. 1996, Appl. Environ. Microbiol. 62: 804-808 publizierte DNA-Sequenz (Genbank: U43237).

- 10 Die Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert wurden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied
15 Biosystems.

Beispiel 15

PCR-Bedingungen für den Nachweis von Salmonellen

- 20 Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, und MgCl₂ Konzentration ergaben sich folgende Bedingungen als optimal:

Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration (in 50 µl)	Menge
25 DNA	5.00		1 fg - 100 ng
Bidest	11.25		
10 x TaqMan Puffer A	5.00	1 x	
25 mM MgCl ₂ Lösung	7.00	3.5 mM	
30 dATP	2.00	200 µM	
dCTP	2.00	200 µM	
dGTP	2.00	200 µM	
dUTP	2.00	400 µM	
5' Primer # 269	5.00		15 pmol
35 Sonde # 333	3.00		6 pmol
3' Primer # 542	5.00		15 pmol
AmpliTaq Gold	0.25		1.25 units
AmpErase UNG	0.50		0.50 units
40	50.00		

Das PCR-Zyklenprofil für die *Salmonella* ssp. PCR:

Cycle	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Wiederholung
Hold	50	2:00	1
Hold	95	10:00	1
Cycle	95	0:15	40
	60	1:00	
Hold	25	5:00	

Für Details siehe Beispiel 3.

5

Beispiel 16**Selektivität des *Salmonella* ssp. PCR-Schnelltests**

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA aus verschiedenen Organismen isoliert und im Fluoreszenz-PCR Test eingesetzt. Die Menge an entstandenen PCR Produkten wurde als CT-Wert (Threshold Cycle) angegeben (CT- Definition s. Beispiel 4).

10

Liste der getesteten DNA-Isolate
(je 10 ng genomische DNS analysiert)

15	Organismus	Resultat (als CT-Wert)
	<i>Salmonella enterica</i>	
	Subspezies	
20	<i>Salmonella</i> typhimurium ATCC 13311	15
	<i>Salmonella</i> typhi	15
	<i>Salmonella</i> agona	15
	<i>Salmonella</i> borismorbificans	15
	<i>Salmonella</i> anatum	15
25	<i>Salmonella</i> brandenburg	15
	<i>Salmonella</i> derby	15
	<i>Salmonella</i> montevideo	15
	<i>Salmonella</i> newport	15
	<i>Salmonella</i> paratyphi B	15
30	<i>Salmonella</i> pullorum	15
	<i>Salmonella</i> dublin	15
	<i>Salmonella</i> enteritidis	15
	<i>Salmonella</i> hadar	15
	<i>Salmonella</i> infantis	15
35	Andere bakterielle Arten	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 1117 (ATCC 27853)	40
	DSM 1128 (ATCC 9027)	40

		DSM 3227 (ATCC 19429)	40
		DSM 50071 (ATCC 10145)	40
	Pseudomonas mirabelis	DSM 788	40
	Staphylococcus aureus	DSM 683	40
5		DSM 1104	40
		DSM 6148	40
		DSM 6538P	40
	Streptococcus faecalis	DSM 2981	40
		DSM 6134	40
10		ATCC 29212	40
	Escherichia coli	DSM 301	40
		DSM 787	40
		DSM 1103	40
		ATCC 8739	40
15	Enterobacter cloacae	DSM 30054	40
	Klebsiella pneumonia	ATCC 10031	40
	Citrobacter freundii	DSM 30040	40
	Eukaryonten		
20	Neurospora crassa		40
	Arabidopsis thaliana		40
	Salmon (Sigma D9156)		40
	Mensch (Perkin Elmer ABD, 401846)		40
	Wasser		40
25			

Lediglich Salmonellen ergaben ein positives Ergebnis im PCR-Schnelltest. Nach 15 PCR Zyklen (CT=15) war erstmals ein linearer Anstieg der Fluoreszenz meßbar, wenn 10 ng *Salmonella* ssp. DNS eingesetzt wurden. Der PCR Test war hochspezifisch. Auch die nahe verwandten *Escherichia coli* Stämme ergaben kein Fluoreszenzsignal im PCR-Schnelltest.

Als Positivkontrolle wurden dieselben bakteriellen DNS, die im *invA*-PCR-Test analysiert worden waren mit dem universellen 16S rRNA PCR System untersucht. Alle bakteriellen DNS ergaben ein positives Signal mit dem 16S rRNA System. D. h. alle DNS ließen sich 16S rRNA-PCR-amplifizieren, aber lediglich die *Salmonella* DNS ließen sich *invA*-PCR-amplifizieren.

Das *invA*-System ist spezifisch für *Salmonella*.

Zusätzlich wurden die entstandenen PCR-Produkte elektrophoretisch analysiert. Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 287 Basenpaaren (ohne Abb.). Kontrollsequenzierungen der PCR-Produkte verifizierten, daß es sich um *invA* DNS handelte (ohne Abb.).

Beispiel 17

Sensitivität des PCR-Schnelltests

Um die Sensitivität des *Salmonella* ssp. PCR-Tests zu bestimmen, wurde genomische *Salmonella typhimurium* DNS präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt (Abb. 5).

Verschiedene Mengen an *Salmonella typhimurium* Genomkopien wurden in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt (Abb. 5). Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten dar. Die Menge an freierwirdender Fluoreszenz und somit an entstehenden PCR-Produkten wird als CT angegeben. Die PCR Reaktion wurde über 40 Zyklen durchgeführt. Der CT-Wert der Wasserkontrolle (NTC = no template control) betrug 40.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNS von 3 Bakterienzellen mittels Fluoreszenz-PCR nachweisen läßt. Der PCR-Schnelltest erlaubt eine lineare Quantifizierung der eingesetzten *Salmonella typhimurium* Genome über 6 log Stufen, d. h. zwischen 3 und 3.000000 KBE.

Beispiel 18

DNA-Freisetzung ohne Voranreicherung in Nährmedien

DNS aus verschiedenen Testmikroorganismen wurde entsprechend Boom et al., 1990, extrahiert, von Proteinen und sonstigen PCR-Inhibitoren gereinigt (Quiagen Säulen Kit, 1995) und in PCR Amplifikationsexperimenten eingesetzt.

Beispiel 19

Nachweis von Bakterien universell

Der Nachweis von Bakterien erfolgte durch erfindungsgemäße spezifische Amplifikation von konservierten 16S rRNA Gensequenzen (SEQ. ID. NO. 5, siehe Beispiel 24). Bestimmte 16S rRNA-spezifische DNA-Sequenzen haben sich im Laufe der Evolution konserviert, sind deshalb im Genom aller Bakterien vorhanden und können als Primer und Sonden zum universellen Nachweis von Bakterien eingesetzt werden (Relman 1993, Weisburg et al. 1991, J. Bacteriol. 173).

Als Resultat von DNS-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischen Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende 16S rRNA-spezifische DNA-Sequenzen als optimales Primer-/SondenKombination bestimmt:

1. PCR Sonde

23 mer: 5'- FAM - TTA AGT CCC GCA ACG AGC GCA AC - TAMRA - 3'

(Sonde 16S rRNA # 1090): [SEQ. ID. NO. 19] Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert worden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

2. PCR Primer

19 mer: 5'- GCA TGG CTG TCG TCA GCT C - 3'

(Primer 16S rRNA forward # 1053*) [SEQ. ID. NO. 18]

5

20 mer: 5'- TGA CGG GCG GTG TGT ACA AG - 3'

(Primer 16S rRNA reverse # 1386*) [SEQ. ID. NO. 20]

* Positionen beziehen sich auf die DNS Sequenz des 16S rRNA Gens (E. coli in Weisburg et al.1991, J. Bacteriol. 173)

Synthese und Reinigung der PCR -Primer -Oligonukleotide erfolgte durch die Firma PE Applied Biosystems und nach deren Protokollen.

Beispiel 20

15 PCR Bedingungen für den Nachweis von Bakterien universell

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, und MgCl₂ Konzentration

Temperatur und Zyklenprofil der PCR und Abstand des Reporterfarbstoffs zum Quencherfarbstoff innerhalb der Sonde ergaben sich folgende Bedingungen als optimal:

20 Folgende Komponenten wurden in einem PCR Reaktionsgefäß (PE Applied Biosystems Best. No. N8010580) gemischt.:

Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration (in 50 µl)	Menge
25 DNA	1.00		1 fg - 100 ng
Bidest Wasser	17.25		
10 x TaqMan Puffer A	5.00	1 x	
25 mM MgCl ₂ Lösung	11.00	5.5 mM	
30 dATP	1.00	200 µM	
dCTP	1.00	200 µM	
dGTP	1.00	200 µM	
dUTP	1.00	400 µM	
5' Primer #1053	5.00	400 nM	20 pmol
35 Sonde #1090	1.00	40 nM	2 pmol
3' Primer #1386	5.00	400 nM	20 pmol
AmpliTaq	0.25		1.25 units
AmpErase UNG	0.50		0.50 units
40	50.00		

Für eine optimale Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist darauf zu achten, daß bei jedem PCR-Lauf möglichst viele Komponenten des PCR-Mixes in einem sogenannten

Mastermix vorgemischt werden. Unter Standardbedingungen wird nur das zu untersuchende DNA-Material (0-15.25 µl) als Komponente in jedes PCR Reaktionsgefäß separat zugeben.

- 5 Das PCR-Zyklusprofil ist wie folgt:

Cycle	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Wiederholung
Hold	50	2:00	1
Hold	95	10:00	1
Cycle	95	0:15	40
Cycle	60	1:00	
Hold	25	5:00	

- 10 Dieses Schema ist kompatibel für PCR-Geräte mit Heizblock, wie z.B.: GeneAMP PCR Geräte 2400 und 9600 und das ABI Prism 7700 Sequence Detection System von Perkin Elmer. Für Details siehe Beispiel 3.

- 15 Nach Abschluß der PCR Reaktionen wurden die Proben in das Fluorimeter LS-50B, mit Zusatz zur Detektion von Fluoreszenz in Mikrotiterplatten der Firma Perkin Elmer transferiert. Messung und Quantifizierung der Fluoreszenzstrahlung erfolgt nach Angaben des Herstellers (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany).

Beispiel 21

Selektivität des universellen bakteriellen PCR-Schnelltests

- 20 Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA von verschiedenen Organismen isoliert und in dem universellen PCR-Test eingesetzt (Abb. 6). Die Menge an entstandenen PCR-Produkten wird in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben (Abb. 6)

Der entwickelte PCR Test detektiert selektiv Bakterien.

- 25 Die unterschiedlichen Signalintensitäten der bakteriellen Proben reflektierten die eingesetzten variablen DNA-Mengen.
- Die entstandenen PCR-Produkte wurden elektrophoretisch analysiert. Die PCR Produkte hatten eine Größe von 330 Basenpaaren (ohne Abb.). Kontrollsequenzierungen dieser PCR-Produkte ergaben, daß es sich tatsächlich um 30 16S rRNA handelte (ohne Abb.). Der PCR-Schnelltest ist 16S rRNA-spezifisch.

Beispiel 22

Sensitivität und Linearität des Schnelltests zum Nachweis von Bakterien

Um die Sensitivität des PCR Tests zu bestimmen, wurde *Salmonella* DNS präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt. Es wurden verschiedene Verdünnungen der DNS hergestellt. Jede Verdünnung wurde dreifach parallel hergestellt und in dem PCR-Test eingesetzt (Abb. 7). Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz wird als sogenannter RQ Wert angegeben.

Der RQ Wert ist die Differenz zwischen der Reporter-(R) Fluoreszenzstrahlung in einer PCR Reaktion, in der Template DNS (hier genomische *Salmonella* DNS) eingesetzt wurde (R^+) und der Reporter-Fluoreszenzstrahlung, in einer PCR-Reaktion, in der keine DNS eingesetzt wurde (R^-). R^- entspricht also der Hintergrundstrahlung. Die Reporter-Strahlung (R) wird jeweils zur Quencher-Strahlung (Q) ins Verhältnis gesetzt. Die Quencher-Strahlung ändert sich während der PCR-Reaktion nicht und stellt somit einen internen Standard dar, gegen den normiert wird.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNS von 1-3 *Salmonella* Bakterien mittels Fluoreszenz-PCR nachweisen ließ. Die Fluoreszenzstrahlung, die nach 40 PCR Zyklen entsteht, liegt signifikant über der Hintergrundstrahlung.

Der Fluoreszenz-PCR-Test erlaubt die lineare Quantifizierung der eingesetzten *Salmonella* Genome über mindestens 4 log Stufen d. h. zwischen 1-3 und 30.000 KBE (Abb. 7).

Beispiel 23

Produktprüfung mit dem bakteriellen Schnelltest

Die Anwendung des entwickelten PCR-Schnelltests wurde durch *spiking* Experimente untersucht. 10 ml WFI (Wasser für Injektionszwecke, Chargen Nr. 63022) wurden mit 50 KBE *Salmonellen* gespickt (5 KBE/ml). DNS wurde aus den verschiedenen, gespickten Proben präpariert (Boom et al. 1990), gereinigt (Qiagen 1995) und im PCR-Schnelltest analysiert (Abb. 8).

Die gespickten *Salmonellen* ließen sich im Prüfprodukt nachweisen. Die Nachweismenge betrug 90% der eingesetzten DNA-Menge (Abb. 8). Dieser Wert reflektiert die Materialverluste, die bei der DNS Präparation aus den gespickten Produkten auftreten. Trotz dieser Verluste ließen sich 1-3 KBE/ml in dem gespickten Prüfprodukt nachweisen. Auf der anderen Seite waren im nicht-gespickten Prüfprodukts keine *Salmonella* Keime detektierbar (Abb. 8). Die Sterilität des Prüfprodukts wurde durch Membranfiltration entsprechend der Methoden in der EP (1997) nachgewiesen.

Beispiel 24

Target-Gen-, Primer- und Sondensequenzen für die verschiedenen Organismen / -
gruppen

SEQ. ID. NO. 1 *Staphylococcus aureus*

5' AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAGTAAGCT AATGGAAAAC ACATATAGAG
ACGTGAATAT TGCTTTAGCT AATGAATTAA CAAAATTG CAATAACTTA
10 AATATTAATG TATTAGTTGT GATTGAAATG GCAAACAAAC ATCCGCGTGT
TAATATCCAT CAACCTGGTC CAGGAGTAGG CGGTCATTGT TTAGCTGTTG
ATCCGTACTT TATT 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)

SEQ. ID. NO. 6 5' AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG 3'

SEQ. ID. NO. 7 5'- TAMRA - CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG - FAM -3'

15 (als reverse complement einsetzen)

SEQ. ID. NO. 8 5' GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TTTATT 3' (als reverse complement einsetzen)

SEQ. ID. NO. 2 *Pseudomonas aeruginosa*

5' CAGGCCTTCG ATGCCCTGAG CGGTATTCAG GCACCGGCGC CCAACGCCGA
20 AGAACTCCAG CATTCTGCC AATTGCTGCT GGACTATGTA TCTGCCGGAC
ACTTCGAGGT CTACGAGCAA CTGACGGCGG AAGGCAAGGC CTTCGGCGAT
CAGCGCGGCC TGGAGCTGGC CAAGCAGATC TTCCCCCGGC TGGAAGCCAT
CACCGAATCC GCGCTGAACT TCAACGACCG CTGCGACAAC GGCGATTGCC
GTGAAGGAGC CTGCCTCATC GCGGAGCTGA AGGTCCTGCG GCAACAGTTG
25 CACGAACGCT 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)

SEQ. ID. NO. 9 5' CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC 3'

SEQ. ID. NO. 10 5' - FAM - CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC - TAMRA - 3'

SEQ. ID. NO. 11 5' CTGAAGGTCC TCGGCAACA GTT 3' (als reverse complement einsetzen)

30 SEQ. ID. NO. 3 *Escherichia coli*

5' AAAGTAGAAC GTAATGGTTC TGTGCATATT GATGCCCCGCG ACGTTAATGT
ATTCTGCGCA CTTACGATC TGGTTAAAC CATGCGTGCT TCTATCTGGG
CGCTGGGGCC GCTGGTAGCG CGCTTTGGTC AGGGGCAAGT TCACTACCT
GGCGGTTGTA CGATCGGTGC GCGTCCGGTT GATCTACACA TTTCTGGCCT
35 CGAACAATTA GGCGCGACCA TC 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)

SEQ. ID. NO. 12 5' GTTC TGTGCATATT GATGCCCCGCG 3'

SEQ. ID. NO. 13 5' - FAM - TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT - TAMRA - 3'

SEQ. ID. NO. 14 5' GCAAGT TTCACTACCT GGCGGTTG 3 (als reverse complement einsetzen)

5 SEQ. ID. NO. 4 **Salmonella ssp.**

5' TGATTGAAGC CGATGCCGGT GAAATTATCG CCACGTTCCG GCAATTCGTT
ATTGGCGATA GCCTGGCGGT GGGTTTTGTT GTCTTCTCTA TTGTCACCGT
GGTCCAGTTT ATCGTTATTA CCAAAGGTTT AGAACGTGTC GCGGAAGTCG
CGGCCCCGATT TTCTCTGGAT GGTATGCCCC GTAAACAGAT GAGTATTGAT
10 GCCGATTTGA AGGCCGGTAT TATTGATGCG GATGCCGCGC GCGAACGGCG
AAGCGTACTG GAAAGGGAAA GCCAGCTTTA CGGTTCTTTT GACGGTGCGA
TGAAGTTTAT 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)

SEQ. ID. NO. 15 5' GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC 3'

SEQ. ID. NO. 16 5' - FAM - CTTCTCTATT GTCACCGTGG TCCA - TAMRA - 3'

15 SEQ. ID. NO. 17 5' GGTTCTTTG ACGGTGCGAT GAAG 3' (als reverse complement einsetzen)

SEQ. ID. NO. 5 **Bakterien**

5' GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTTGTGAAA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA
CGAGCGCAAC CCTTATCCTT TGTTGCCAGC GGTCCGGCCG GGAAGTCAAA
20 GGAGACTGCC AGTGATAAAC TGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAGTCAT
CATGGCCCTT ACGACCAGGG CTACACACGT GCTACAATGG CGCATACAAA
GAGAAGCGAC CTCGCGAGAG CAAGCGGACC TCATAAAGTG CGTCGTAGTC
CGGATTGGAG TCTGCAACTC GACTCCATGA AGTCGGAATC GCTAGTAATC
GTGGATCAGA ATGCCACGGT GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACCGC
25 CCGTCA 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)

(am Beispiel *E. coli*, Weisburg et al. 1991, J. Bakteriol. 173: 598.)

SEQ. ID. NO. 18 5' GCATGGCTGT CGTCAGCTC 3'

SEQ. ID. NO. 19 5' - FAM - TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC - TAMRA - 3'

SEQ. ID. NO. 20 5' CTTGTACACA CCGCCCGTCA 3' (als reverse complement einsetzen)

30

Beispiel 25

Varianten in den Primer- und Sondensequenzen.

Als Varianten werden die Primer- / Sondensequenzkombinationen definiert, die die Target-DNA-Sequenzen mit gleicher Spezifität (100%) und vergleichbarer Sensitivität
35 (>70%) detektieren, wie die in Beispiel 24 angegebenen Sequenzen.

Forward Primer

Sonde

Reverse Primer

5 ***Staphylococcus aureus*** (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 3)

[SEQ.ID.NO 6]AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG/[SEQ.ID.NO 7]TAMRA-
CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG-FAM / [SEQ.ID.NO 8]GTTTAGCTGT
TGATCCGTAC TTTATT

10 [SEQ.ID.NO 6] AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG / [SEQ.ID.NO
7]TAMRA-CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG-FAM / [SEQ.ID.NO 23]
CATTGTTTGTAGCTGT TGATCCGTAC T

15 [SEQ.ID.NO 24]GCACGT ACTGCTGAAA TGAGTAAG/[SEQ.ID.NO
7]TAMRA-CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG-FAM / [SEQ.ID.NO 8]GTTTAGCTGT
TGATCCGTAC TTTATT

***Pseudomonas aeruginosa* (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 7)**

20 [SEQ.ID.NO 9]CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC/[SEQ.ID.NO 10]FAM-
CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 11]CTGAAGGTCC
TGCGGCAACA GTT

25 [SEQ.ID.NO 25]CAGGCCTTCG ATGCCCTGA GC / [SEQ.ID.NO 10]FAM-
CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTT-TAMRA/[SEQ.ID.NO 11]CTGAAGGTCC
TGCGGCAACA GTT

[SEQ.ID.NO 9]CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC/[SEQ.ID.NO 10]FAM-
CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC-TAMRA/[SEQ.ID.NO
26]GCTGAAGGTCC TGCGGCAACA G

30

***Escherichia coli* (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 11)**

35 [SEQ.ID.NO 12]GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG/[SEQ.ID.NO 13]FAM-
TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA/[SEQ.ID.NO 14]GCAAGTTTCA
CTACCTGGCG GTTG

[SEQ.ID.NO 27]TAGAACGTAA TGGTTCTGTGC AT/[SEQ.ID.NO 13]FAM-
TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA /[SEQ.ID.NO 14]GCAAGTTTCA
CTACCTGGCG GTTG

5

[SEQ.ID.NO 12]GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG /[SEQ.ID.NO
13]FAM-TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA/[SEQ.ID.NO
28]CTGGCCTCGA ACAATTAGGC GCG

10 [SEQ.ID.NO 27]TAGAACGTAA TGGTTCTGTGC AT/ [SEQ.ID.NO 13]FAM-
TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA /[SEQ.ID.NO 28]CTGGCCTCGA
ACAATTAGGC GCG

Salmonella ssp (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 15)

15 [SEQ.ID.NO 15]GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC/[SEQ.ID.NO 16]FAM-
CTTCTCTATTGTCACCGTGG TCCA-TAMRA/[SEQ.ID.NO 17]GGTTCCTTTG
ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 15]GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC / [SEQ.ID.NO 21]
20 FAM-TT (T/C) GTTATTGGCGATAGCCTGGC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 17]
GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 15]GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC/[SEQ.ID.NO 22]
TAMRA-TTCTCTGGATGGTATGCCCGGTA-FAM / [SEQ.ID.NO 17]
25 GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

Bakterien (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 20)

[SEQ.ID.NO 18]GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 19]FAM-
TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 20]CTTGTACACA
30 CCGCCCGTCA

[SEQ.ID.NO 29]TGCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 19]FAM-
TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 20]CTTGTACACA
CCGCCCGTCA

[SEQ.ID.NO 18]GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 30]FAM-
TTGGGTAAAGTCCCG CAACGAGC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 20]CTTGACACA
CCGCCCCGTCA

5

Enterobacteriaceae (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 30)

Varianten in den Primer- und Sondensequenzen

[SEQ.ID.NO 44]GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 46]FAM-
10 TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45]TTTATGAGGT
CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 50]GTGCTGCATG GCTGTCGTC / [SEQ.ID.NO 46]FAM-
TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45]TTTATGAGGT
15 CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 44]GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 51]FAM-
AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45]TTTATGAGGT
CCGCTTGCTC

20

Beispiel 26

Fehlvarianten in den Primer- und Sondensequenzen.

Als Fehlvarianten werden die Primer- / Sondenkombinationen definiert, die die Target-DNA-Sequenzen mit nicht zufriedenstellender Spezifität (<100%) und Sensitivität
25 (<70%) detektieren, wie die in Beispiel 24 angegebenen Sequenzen.

vgl. Figur mit Primern und Sonden

Forward Primer

Sonde

Reverse Primer

30 ***Staphylococcus aureus* (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 3)**

[SEQ.ID.NO 31]ATGCACGTAC TGCTGAAATG AG / [SEQ.ID.NO 32]
FAM-AACACATATA GAGACGTGAA TATTGC- TAMRA / [SEQ.ID.NO 33]
GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TT

[SEQ.ID.NO 6] AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG / [SEQ.ID.NO 32]
FAM-AACACATATA GAGACGTGAA TATTGC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 23]
CATTGTTTAGCTGT GATCCGTAC T
[SEQ.ID.NO 24] GCACGT ACTGCTGAAA TGAGTAAG / [SEQ.ID.NO 32]
5 FAM-AACACATATA GAGACGTGAA TATTGC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 8]
GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TTTATT

Pseudomonas aeruginosa (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 7)
[SEQ.ID.NO 9] CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC / [SEQ.ID.NO 34] FAM
10 - CAATTGCTGC TGGACTATGT ATCTG- TAMRA / [SEQ.ID.NO 1]
CTGAAGGTCC TGC GGCAACA GTT

[SEQ.ID.NO 35] CAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC / [SEQ.ID.NO 34]
FAM-CAATTGCTGC TGGACTATGT ATCTG-TAMRA / [SEQ.ID.NO 11]
15 CTGAAGGTCC TGC GGCAACA GTT

[SEQ.ID.NO 9] CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC / [SEQ.ID.NO 36] FAM-
AACGCCGA AGAACTCCAG CATTCTGC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 26]
GCTGAAGGTCC TGC GGCAACA G

20 [SEQ.ID.NO 9] CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC / [SEQ.ID.NO 36] FAM-
AACGCCGA AGAACTCCAG CATTCTGC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 11]
CTGAAGGTCC TGC GGCAACA GTT

25

Escherichia coli (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 11)

[SEQ.ID.NO 12] GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG / [SEQ.ID.NO 13]
FAM-TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA / [SEQ.ID.NO 37]
30 CATTCTGGC CTCGAACAAT TA

[SEQ.ID.NO 27] TAGAACGTAA TGGTTCTGTGC AT / [SEQ.ID.NO 38]
FAM-CCGCTGGTAG CGCG (T/C) TTTGG TCA-TAMRA / [SEQ.ID.NO 14]
GCAAGTTTCA CTACCTGGCG GTTG

[SEQ.ID.NO 12] GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG/[SEQ.ID.NO 38]
FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/[SEQ.ID.NO 37]
CATTTCTGGC CTCGAACAAT TA

5

[SEQ.ID.NO 39] ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG / [SEQ.ID.NO 13]
FAM-TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA / [SEQ.ID.NO 28]
CTGGCCTCGA ACAATTAGGC GCG

10 [SEQ.ID.NO 39] ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG/[SEQ.ID.NO 38]
FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/[SEQ.ID.NO 28]
CTGGCCTCGA ACAATTAGGC GCG

[SEQ.ID.NO 39] ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG/[SEQ.ID.NO 38]
15 FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 37]
CATTTCTGGC CTCGAACAAT TA

[SEQ.ID.NO 39] ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG/[SEQ.ID.NO 38]
FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 14]
20 GCAAGTTTCA CTACCTGGCG GTTG

Salmonella ssp (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 15)

[SEQ.ID.NO 40] TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT/[SEQ.ID.NO 16]
25 FAM-CTTCTCTATTGTCACCGTGG TCCA-TAMRA/[SEQ.ID.NO 17]
GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 40] TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT/[SEQ.ID.NO 21]
FAM-TT(T/C)GTTATTGGCGATAGCCTGGC-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 17]
30 GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 40] TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT/[SEQ.ID.NO 22]
TAMRA-TTCTCTGGATGGTATGCCCCGTA-FAM / [SEQ.ID.NO 17]
GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 40] TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT/[SEQ.ID.NO 41]
FAM-TTGTTGTCT TCTCTATTGT CACC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 17]
GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

5

[SEQ.ID.NO 15] GTGAAATTAT CGCCACGTTT GGGC/[SEQ.ID.NO 41]
FAM-TTGTTGTCT TCTCTATTGT CACC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 17]
GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

10 **Bakterien (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 20)**

[SEQ.ID.NO 18] GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 19] FAM-
TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 42] AAGTCGTAAC
AAGGTAACCA

15

[SEQ.ID.NO 29] TGCATGGCTG TCGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 19] FAM
- TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC - TAMRA / [SEQ.ID.NO 42]
AAGTCGTAAC AAGGTAACCA

20 [SEQ.ID.NO 43] GGATTAGATA CCCTGGTAGT C / [SEQ.ID.NO 30] FAM
- TTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGC - TAMRA / [SEQ.ID.NO 20]
CTTGTAACA CCGCCCGTCA

[SEQ.ID.NO 43] GGATTAGATA CCCTGGTAGT C / [SEQ.ID.NO 30] FAM
25 - TTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGC - TAMRA / [SEQ.ID.NO 42]
AAGTCGTAAC AAGGTAACCA

Enterobacteriaceae (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 30)

30 [SEQ.ID.NO 44] GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 46] FAM-
TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45] TTTATGAGGT
CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 44] GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 52] FAM-
ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACG-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45] TTTATGAGGT
CCGCTTGCTC

5 [SEQ.ID.NO 50] GTGCTGCATG GCTGTCGTC / [SEQ.ID.NO 52] FAM-
ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACG-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45] TTTATGAGGT
CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 53] GCTGTCGTCA GCTCGTGTT / [SEQ.ID.NO 46] FAM-
10 TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45] TTTATGAGGT
CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 53] GCTGTCGTCA GCTCGT GTT / [SEQ.ID.NO 46] FAM-
TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 54] AACTTTATGA
15 GGTCCGCTTG C

[SEQ.ID.NO 44] GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 46] FAM-
TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 54] AACTTTATGA
GGTCCGCTTG C
20

Entwicklung eines PCR-Schnelltests zum Nachweis von Enterobacteriaceae

Die nachfolgenden Beispiele beschreiben den entwickelten Schnelltest inklusiv
25 aller Sequenzvariationen und Targetsequenzen.

(I) Schnelltest zum Nachweis von Enterobacteriaceae mit Angabe der Target-Sonden-
und Primersequenzen (Beispiele 27-31)

(III) Fehlvarianten in den Primer- und Sondensequenzen (Beispiel 32)

Beispiel 27

Nachweis von Arten der Familie Enterobacteriaceae

Für die Entwicklung eines diagnostischen PCR-Schnelltests für Enterobacteriaceae
wurde ein Gen gesucht, das auf der einen Seite genügend konservierte Bereiche
aufweisen konnte, um die zahlreichen Arten der Familie Enterobacteriaceae
35 nachweisen zu können, das auf der anderen Seite aber auch ausreichend variable

Bereiche enthalten mußte, um die Detektion der nicht zu den Enterobacteriaceae gehörenden Bakterien ausschließen zu können. Mit dem bakteriellen 16S rRNA-Gen wurde ein Target gewählt, das beide Bedingungen erfüllt.

Das 16S rRNA-Gen kodiert für die bakterielle ribosomale DNA, die zusammen mit der
5 23S rRNA und der 5S rRNA in Kombination mit den ribosomalen Proteinen den Translationsapparat für die Proteinbiosynthese bilden.

**Als Resultat von DNS-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischer Optimierungsarbeiten unter Verwendung verschiedener Primer- und
10 Sondenkombinationen, wurden folgende spezifische DNS-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:**

Als Ergebnis von Sequenzvergleichen und praktischer Optimierungsarbeiten wurde für den Nachweis von Enterobacteriaceae folgende optimale Kombination von Primern und Sonde ermittelt:

15 Forward-Primer (#1053) 5'-GCA TGG CTG TCG TCA GCT C-3' [SEQ. ID. NO. 44]
Reverse-Primer (#1270) 5'-TTT ATG AGG TCC GCT TGC TC-3' [SEQ. ID. NO.45]

Sonde (#1090) 5'-Fam-TTA AGT CCC GCA ACG AGC GCA AC-Tamra-3' [SEQ. ID. NO. 46]

20

Die Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert wurden.

25 Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

Die numerischen Bezeichnungen der Oligonukleotide beziehen sich auf die Positionen des Leitstranges der von Brosius et al. 1978 veröffentlichten Sequenz für die 16S rRNA von *Escherichia coli*.

30 Die Lokalisation dieser Sequenzen innerhalb des 16S rRNA-Gens ist in SEQ. ID. NO. 24 dargestellt. Die Größe des durch die Primer 1053 und 1270 begrenzten Amplikons beträgt 238 bp.

Targetsequenz des 16S rRNA Gens SEQ. ID. NO. 47

35 (Forward-Primer #1053) 5'-GCATGGCTGTCGTCAGCTC-3' aus

5'-

CTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAA 1082
 GAAGCCCTTGGCACTCTGTCCACGACGTACCGACAGCAGTCGAGCACAACACTTT

Sequence Identifier Number 48: (Sonde #1090)

- 5 5'-Fam-TTAAgTCCCgCAACgAgCgCAAC-Tamra-3' aus
 TGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCC 1137
 ACAACCCAATTCAGGGCGTTGCTCGCGTTGGGAATAGGAAACAACGGTCGCCAGG
 GGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGAC 1192
 CCGGCCCTTGAGTTTCCTCTGACGGTCACTATTTGACCTCCTTCCACCCCTACTG
 10 GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCAT 1247
 CAGTTCAGTAGTACCGGGAATGCTGGTCCCGATGTGTGCACGATGTTACCGCGTA
 ACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTC 1302
 TGTTTCTCTTCGCTGGAGCGCTCTCGTTCGCCTGGAGTATTTACGCAGCATCAG
- 15 Sequence Identifier Number 49: 3'-TCGTTGCCTGGAGTATTT-5'
 (Reverse-Primer #1270)

- Lokalisation der Primer und der Sonde für den spezifischen Nachweis für Enterobacteriaceae:** Dargestellt ist ein Ausschnitt der für die 16S rRNA codierenden Sequenz. Die Ziffern am rechten Rand der Sequenz geben die Position des jeweils letzten in einer Zeile stehenden Nukleotids an. Die Positionen beziehen sich auf die von Brosius et al. (1978) veröffentlichte Sequenz. Die Primer und die Sonde sind entsprechend ihrer Position im 16S rRNA-Gen aufgeführt. FAM: Fluorescein-Derivat als Reporter, TAMRA: Tetramethylrhodamin-Derivat als Quencher.
- 25

Beispiel 28

PCR-Bedingungen für den Nachweis von Enterobacteriaceae

- Zusammensetzung und Komponenten des TaqMan-PCR-Reaktionsansatzes für den Nachweis von Enterobacteriaceae:**
- 30

- In Spalte eins sind die einzelnen Komponenten des PCR-Reaktionsansatzes aufgelistet. Die eingesetzten Volumina pro Reaktionsansatz sind in Spalte zwei aufgeführt, während Spalte drei die finale Konzentration der einzelnen Komponenten im Reaktionsansatz wiedergibt. In Spalte vier sind die Stoffmengen der einzelnen Komponenten für eine 50 µl-PCR angegeben. UNG: Uracil-N-Glycosylase.
- 35

Komponente	Volumen	finale Konzentration	Stoffmenge (in 50µl)
Template (DNA)	5.00 µl	0.1 fg/µl - 20pg/µl	5fg-1ng
Aqua bidest.	11.25 µl	/	/
10x TaqMan-Puffer A	5.00 µl	1x	/
25 mM MgCl ₂	7.00 µl	3.5 mM	175 nmol
1,25 mM dATP	2.00 µl	50 µM	2.5 nmol
1,25 mM dCTP	2.00 µl	50 µM	2.5 nmol
1,25 mM dGTP	2.00 µl	50 µM	2.5 nmol
2,50 mM dUTP	2.00 µl	0.1 mM	5.0 nmol
3 µM Forward-Primer #1053	5.00 µl	0.3 µM	15.0 pmol
3 µM Reverse-Primer #1270	5.00 µl	0.3 µM	15.0 pmol
2 µM Sonde #1090	3.00 µl	0.12 µM	6.0 pmol
5 U/µl AmpliTaq Gold	0.25 µl	25 mU/µl	1.25 U
1 U/µl AmpErase UNG	0.50 µl	10 mU/µl	0.5 U
	<u>Σ 50.0 µl</u>		

Folgendes PCR-Zyklusprofil wurde für den Nachweis von Enterobacteriaceae erstellt:

Schritt	Dauer In min	Temperatur In °C	Wiederholungen
Halten1	2	50	1
Halten 2	10	95	1
Cyclus 1	¼	95	40
	1	60	
Halten 3	2	25	1

5

PCR-Profil für den Nachweis von Enterobacteriaceae.

In Spalte eins sind die einzelnen Komponenten des PCR-Reaktionsansatzes aufgelistet. Die eingesetzten Volumina pro Reaktionsansatz sind in Spalte zwei
10 aufgeführt, während Spalte drei die finale Konzentration der einzelnen Komponenten im Reaktionsansatz wiedergibt. In Spalte vier sind die Stoffmengen der einzelnen Komponenten für eine 50 µl-PCR angegeben. UNG: Uracil-N-Glycosylase.

Beispiel 29

15 Selektivität zum Nachweis von Enterobacteriaceae:

Die gram-negative Familie der Enterobacteriaceae gehört zur Gamma-Gruppe der Proteobacteria (Balows et al. 1991, Holt 1989). Zu den Proteobacteria gehören außerdem die Mitglieder der Alpha-, der Beta-, der Delta-, und der Epsilon-Gruppe

sowie Amoebobacter und einige unklassifizierte Proteobacteria. Abbildung 9 zeigt ein vereinfachtes taxonomisches Schema zur Einordnung der Enterobacteriaceae.

Die Ähnlichkeit von DNA-Sequenzen verschiedener Spezies steigt in der Regel mit zunehmendem Verwandtschaftsgrad. Die Möglichkeit einer nicht-erwünschten Kreuzreaktion ist deshalb bei nah-verwandten Spezies wahrscheinlicher, als bei weniger verwandten Spezies. Die Spezifität des entwickelten PCR-Schnelltests zum Nachweis von Enterobacteriaceae wurde deshalb vor allem an genomischer DNA von nahen Verwandten der Enterobacteriaceae untersucht.

Dreißig verschiedene Enterobacteriaceae-Arten und vierzehn nicht zu den Enterobacteriaceae zählende Bakterienarten wurden überprüft.

Alle getesteten Gattungen der Enterobacteriaceae wurden durch den entwickelten PCR-Schnelltest erfaßt. Die mit Enterobacteriaceae stark verwandten Bakterien, zu denen insbesondere die Vertreter der Gamma-Gruppe zu zählen sind, als auch kaum verwandte Bakterien, vor allem die Vertreter der Firmicutes (gram positive-Bakterien), zeigten dagegen keine Reaktion mit dem System.

Liste der getesteten Enterobacteriaceae:

Jeweils 1 ng genomische DNA der in Spalte eins aufgeführten Spezies der Enterobacteriaceae wurden zur Spezifitätsprüfung eingesetzt. Die verwendeten Stämme können Spalte zwei entnommen werden. In Spalte drei ist das Resultat der jeweiligen Untersuchung als + (positive Reaktion) bzw. - (negative Reaktion) mit dem PCR-Schnelltest für Enterobacteriaceae angegeben.

Arten der Familie	Stämme	Resultat (+/-)
Enterobacteriaceae		
<i>Budvicia aquatica</i>	DSM 5075	+
<i>Buttiauxella agrestis</i>	DSM 4586	+
<i>Cedecea davisae</i>	DSM 4568	+
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30040	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	DSM 30052	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	+
<i>Erwinia amylovora</i>	DSM 30165	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739, DSM 301, DSM 787	+
<i>Ewingella americana</i>	DSM 4580	+
<i>Hafnia alvei</i>	DSM 30163	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM10031	+
<i>Kluyvera ascorbata</i>	DSM 4611	+
<i>Leclercia</i>	DSM 5077	+
<i>adecarboxylata</i>		
<i>Leminorella grimalti</i>	DSM 5078	+
<i>Levinea malonatica</i>	DSM 4596	+

Moellerella	DSM 5076	+
wisconsensis		
Morganella morganii	DSM 30164	+
Pantoea agglomerans	DSM 3493	+
Photorhabdus	DSM 3368	+
luminescens		
Pragia fontium	DSM 5563	+
Proteus mirabilis	DSM 788	+
Providencia stuartii	DSM 4539	+
Rhanella aquatilis	DSM 4594	+
Salmonella typhimurium	ATCC 13311	+
Serratia marcescens	DSM 3370	+
Shigella flexneri	DSM 4782	+
Tatumella pyseos	DSM 5000	+
Xenorhabdus	DSM 3370	+
nematophilus		
Yersinia enterocolitica	DSM 4780	+

Liste der getesteten Bakterienstämme, die nicht den Enterobacteriaceae

5 zugerechnet werden:

Jeweils 2 ng genomische DNA der in Spalte eins aufgeführten Bakterienspezies wurden zur Spezifitätsprüfung eingesetzt. Die Zugehörigkeit der jeweiligen Spezies zu einer bestimmten Überordnung zeigt Spalte 2. Die verwendeten Stämme können Spalte drei entnommen werden. In Spalte vier ist das Resultat der jeweiligen Untersuchung als + (positive Reaktion) bzw. - (negative Reaktion) mit dem PCR-Schnelltest für Enterobacteriaceae angegeben.

Nah verwandte Arten der Enterobacteriaceae	Einordnung	Stamm	Resultat (+/-)
Acetobacter pasteurianus	Gamma-Gruppe	DSM 3509	-
Acinetobacter calcoaceticus	Gamma-Gruppe	DSM 6962	-
Aeromonas enteropelogenes	Gamma-Gruppe	DSM 6394	-
Alcaligenes faecalis	Beta-Gruppe	DSM 30030	-
Chromobacterium violaceum	Beta-Gruppe	DSM 30191	-
Enterococcus faecalis	Firmicutes	ATCC 29212	-
Halomonas elongata	Gamma-Gruppe	DSM 2581	-
Helicobacter pylori	Epsilon-Gruppe	DSM 4867	-
Listeria monocytogenes	Firmicutes	DSM 20600	-
Micrococcus luteus	Firmicutes	DSM 1605	-
Pseudomonas aeruginosa	Gamma-Gruppe	DSM 3227	-
Staphylococcus aureus	Firmicutes	ATCC 6538P	-
Staphylococcus epidermidis	Firmicutes	ATCC 12228	-
Vibrio proteolyticus	Gamma-Gruppe	DSM 30189	-

Beispiel 30

Sensitivität des PCR-Schnelltests

- Für die Experimente zur Bestimmung der Sensitivität des PCR-Schnelltests für Enterobacteriaceae wurde stellvertretend für die übrigen Enterobacteriaceae genomische *Escherichia coli*-DNA vom Stamm ATCC 8739 eingesetzt. Die Detektionsbreite des entwickelten PCR-Schnelltest für Enterobacteriaceae reicht nach diesen Untersuchungen von weniger als 5 KBE (entspricht 25 fg genomischer DNA) bis über 5000000 KBE (entspricht 25 ng genomischer DNA) *Escherichia coli* (Abbildung 10).
- No-Template-Kontrollen (ohne Enterobacteriaceae-DNA) zeigen auch nach 40 Zyklen keine Reaktion mit dem entwickelten PCR-Schnelltest.

Beispiel 31

Produktanalyse

- Steriles Wasser für Injektionszwecke (WFI, Charge 63022) wurde untersucht. Das Untersuchungsergebnis ergab Abwesenheit von Enterobacteriaceae-DNA.

Beispiel 32

Fehlvarianten in den Primer- und Sondensequenzen

- Als Fehlvarianten werden die Primer- / Sondenkombinationen definiert, die die Target-DNS-Sequenzen mit nicht zufriedenstellender Spezifität (<100%) und Sensitivität (<70%) detektieren, wie die in Beispiel 27 angegebenen Sequenzen.

Literatur für die Beispiele:

- Balows, A., Truper, H., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.-H. (1991)
The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Second Edition,
Vol 1-4, Springer-Verlag, New York NY
- Brosius, J., Palmer, J. L., Kennedy, J.P. & Noller, H.F. (1978)
Complete Nucleotide Sequence of a 16S Ribosomal RNA Gene from *Escherichia coli*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4801-4805
- Holt, J. (editor in chief) (1989) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, First Edition, Vol 1-4, Williams & Williams, Baltimore MD

L e g e n d e n z u d e n A b b i l d u n g e n

Legende zur Abb. 1:

Die DNA (10 ng pro Spur, 2-14) aller eingesetzten *S. aureus* Stämme (Lane 2 – 5) wurde von den *cap8-0* Primern (# 15297 und # 15485) detektiert. Dem gegenüber wurde die DNA einer nahe verwandten *Staphylococcus* Art. *S. epidermidis* (Lane 6), und die anderer bakterieller Gattungen (Lane 7 – 11) nicht detektiert. Pilz, Fisch und menschliche DNA (Lane 12 – 14) wurden als Kontrollen eingesetzt und ergaben kein Detektionssignal. NTC (= no template control) ist die Wasserkontrolle, in der keine DNA eingesetzt wurde.

10

Legende zur Abb. 6:

Die DNA (1 - 10 ng) aller eingesetzten Bakterien (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Streptococcus faecalis*) wurde von dem 16S rRNA Primer/Sonden Set detektiert. Wurde genomische DNA (10 ng) von Pilzen (*Neurospora crassa*), Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*) oder vom Menschen (*Human*, Perkin Elmer ABI, 401846) eingesetzt, so entsprach die gemessene Fluoreszenzstrahlung der Wasserkontrolle (no DNA control).

15

Legende zur Abb. 7

Fluoreszenzstrahlung in Abhängigkeit von der Menge an eingesetzter *Salmonella* DNS. In dem PCR-Schnelltest wurden *Salmonella* DNS Mengen eingesetzt, die aus 1-3, 50, 500 usw. Keimen isoliert wurde. Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz wird als sogenannter RQ Wert angegeben.

20

$$RQ = (R^+ / Q) - (R^- / Q)$$

25

Legende zur Abb. 8:

Wasser für Injektionszwecke (10 ml Analysenvolumen) wurde jeweils in vier unabhängigen Experimenten auf die Gegenwart von Bakterien analysiert. Als positive Kontrolle wurden 250 fg genomischer *Salmonella* DNS eingesetzt (Abb. 8, ganz links). Parallel wurde das Prüfprodukt mit 50 KBE / 10 ml *Salmonella* gespikt und dann analysiert (jeweils rechts). Es werden die Einzelergebnisse dargestellt.

30

35

Legende zur Abb. 9:

Schematische Darstellung taxonomischer Beziehungen der Enterobacteriaceae:

Die einzelnen Gattungen der Enterobacteriaceae gehören zur Gamma-Gruppe der Proteobacteria. Diese sind eingegliedert in die Eubacteria. Aus diesem Schema ergaben sich die Überlegungen zu den Spezifitätsprüfungen. Zum Nachweis der Spezifität des entwickelten PCR-Schnelltests für Enterobacteriaceae wurden hauptsächlich Vertreter der Gamma-Gruppe und einige Mitglieder anderer Gruppen der Proteobacteria herangezogen.

10 Legende zur Abb. 10:

Sensitivität des PCR-Schnelltests für Enterobacteriaceae:

Dargestellt sind die erhaltenen Ct-Werte in Abhängigkeit der eingesetzten keimbildenden Einheiten (KBE) Enterobacteriaceae.

15

Patentansprüche:

1. Testkit zum Nachweis mikrobieller Verunreinigungen nicht steriler Produkte, insbesondere nach GMP-Richtlinien, auch Kosmetika und Lebensmittel, umfassend
 5 mindestens ein DNA-Fragment, das die folgenden SEQ ID und Spacer (Abstandhalter) umfaßt:

- (a) einen Forward-Primer (SEQ ID Forward-Primer);
- (b) eine Sonde (SEQ ID Sonde);
- (c) einen Reverse-Primer (SEQ ID Reverse-Primer);
- 10 (d) gegebenenfalls einen Spacer zwischen Forward-Primer und Sonde,
- (e) gegebenenfalls einen Spacer zwischen Sonde und Reverse-Primer,
- (f) gegebenenfalls einen Spacer upstream des Forward-Primers
- (g) gegebenenfalls einen Spacer downstream des Reverse-Primers
 - wobei die SEQ ID [(SEQ ID Forward-Primer); (SEQ ID Sonde);
 - 15 und (SEQ ID Reverse-Primer)] auch Varianten umfassen, bei denen eine, zwei oder drei Nukleotide substituiert, deletiert und / oder insertiert sind,
 - dabei hat die Variante im wesentlichen dieselbe Funktion wie die Sequenz der SEQ ID [(SEQ ID Forward-Primer); (SEQ ID
 - 20 Sonde); und (SEQ ID Reverse-Primer)],
 - bei Sonden die Funktion der Bindung an DNA und bei Primern die Funktion der Bindung an DNA und die Bereitstellung eines verlängerbaren 3' Endes für die DNA-Polymerase;
 - 25 - wobei die Spacer 0-40 Nukleotiden umfassen,

das DNA-Fragment genommen aus der Gruppe

- (i) für *Staphylococcus aureus*
 - SEQ. ID. NO. 6 als Forward-Primer
 - 30 SEQ. ID. NO. 7 als Sonde und
 - SEQ. ID. NO. 8 als Reverse-Primer
- (ii) für *Pseudomonas aeruginosa*
 - SEQ. ID. NO. 9 als Forward-Primer
 - SEQ. ID. NO. 10 als Sonde und
 - 35 SEQ. ID. NO. 11 als Reverse-Primer

- (iii) für *Escherichia coli*
SEQ. ID. NO. 12 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 13 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 14 als Reverse-Primer
- 5 (iv) für *Salmonella ssp.*
SEQ. ID. NO. 15 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 16 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 17 als Reverse-Primer
- (v) für Bakterien
10 SEQ. ID. NO. 18 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 19 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 20 als Reverse-Primer
- (vi) für Enterobacteriaceae
SEQ. ID. NO. 44 als Forward-Primer
15 SEQ. ID. NO. 46 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 45 als Reverse-Primer
oder
- (vii) für Enterobacteriaceae (16S rRNA)
SEQ. ID. NO. 47 als Forward-Primer
20 SEQ. ID. NO. 48 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 49 als Reverse-Primer

oder weiterhin all die Sequenzen, welche komplementär zu den vorherigen Sequenzen
SEQ ID NO 6 bis 49 sind.

25

2. Verfahren zur Detektion von Mikroorganismen in Produkten, insbesondere
Arzneimitteln oder Kosmetika, welches Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Einsetzen von Primern und fluoreszenzmarkierten Sonden mit den
entsprechenden Sequenzen und deren Variationen,
- 30 (i) für *Staphylococcus aureus*
SEQ. ID. NO. 6 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 7 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 8 als Reverse-Primer
- (ii) für *Pseudomonas aeruginosa*
35 SEQ. ID. NO. 9 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 10 als Sonde und

- SEQ. ID. NO. 11 als Reverse-Primer
- (iii) für *Escherichia coli*
- SEQ. ID. NO. 12 als Forward-Primer
- SEQ. ID. NO. 13 als Sonde und
- 5 SEQ. ID. NO. 14 als Reverse-Primer
- (iv) für *Salmonella ssp.*
- SEQ. ID. NO. 15 als Forward-Primer
- SEQ. ID. NO. 16 als Sonde und
- SEQ. ID. NO. 17 als Reverse-Primer
- 10 (v) für Bakterien
- SEQ. ID. NO. 18 als Forward-Primer
- SEQ. ID. NO. 19 als Sonde und
- SEQ. ID. NO. 20 als Reverse-Primer
- (vi) für Enterobacteriaceae
- 15 SEQ. ID. NO. 44 als Forward-Primer
- SEQ. ID. NO. 46 als Sonde und
- SEQ. ID. NO. 45 als Reverse-Primer oder
- (vii) für Enterobacteriaceae (16S rRNA)
- SEQ. ID. NO. 47 als Forward-Primer
- 20 SEQ. ID. NO. 48 als Sonde und
- SEQ. ID. NO. 49 als Reverse-Primer
- oder weiterhin all die Sequenzen, welche komplementär zu den vorherigen Sequenzen
SEQ ID NO 6 bis 49 sind.

- 25 b) Vervielfältigen der DNA mit PCR; und
- c) Bestrahlung mit spezifischen Wellenlängen, die den Fluoreszenzfarbstoff
anregen.
- d) Messung und Quantifizierung der Emission des angeregten
Fluoreszenzfarbstoffes.

30

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Herstellung der Sonden auf der TaqMan-Detektionstechnologie beruht.

Abb. 1

Abb. 1

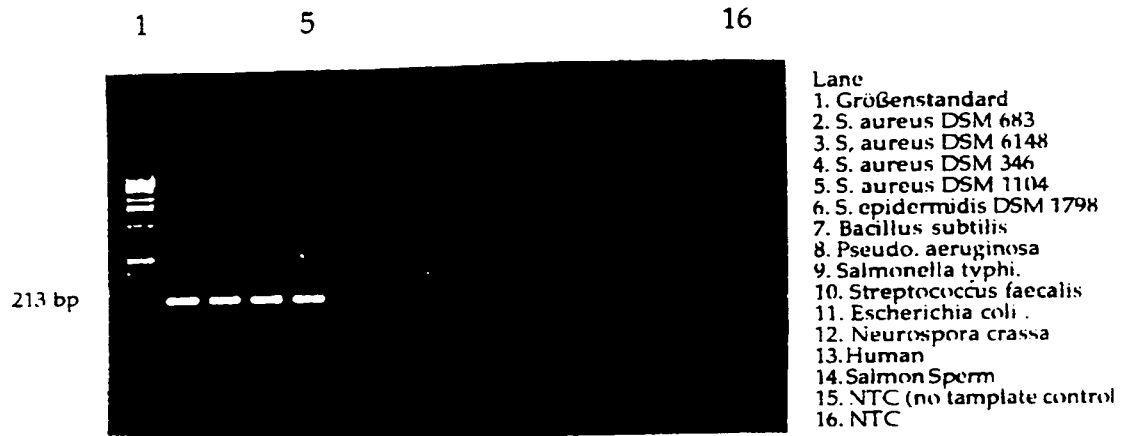


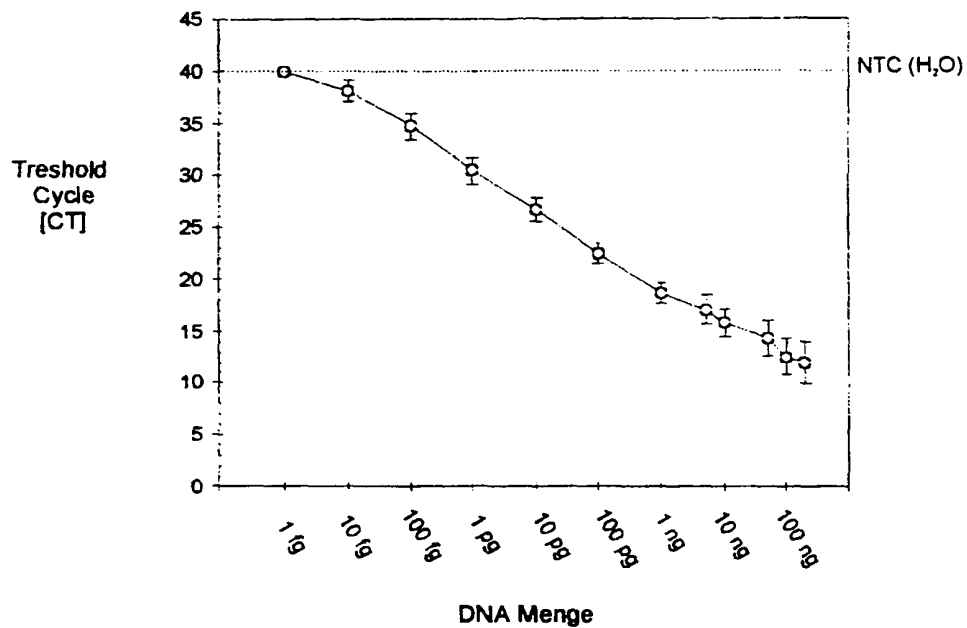
Abb. 2

Abb. 4

Escherichia coli murA Amplification

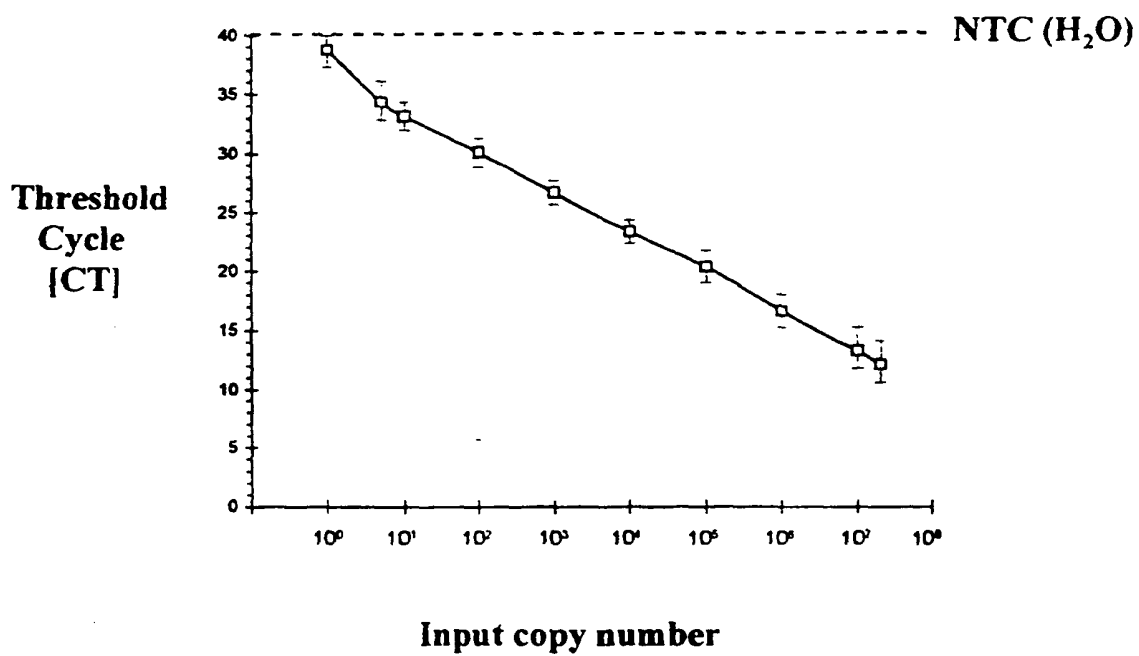


Abb. 5
***Salmonella sp. invA* Amplification**

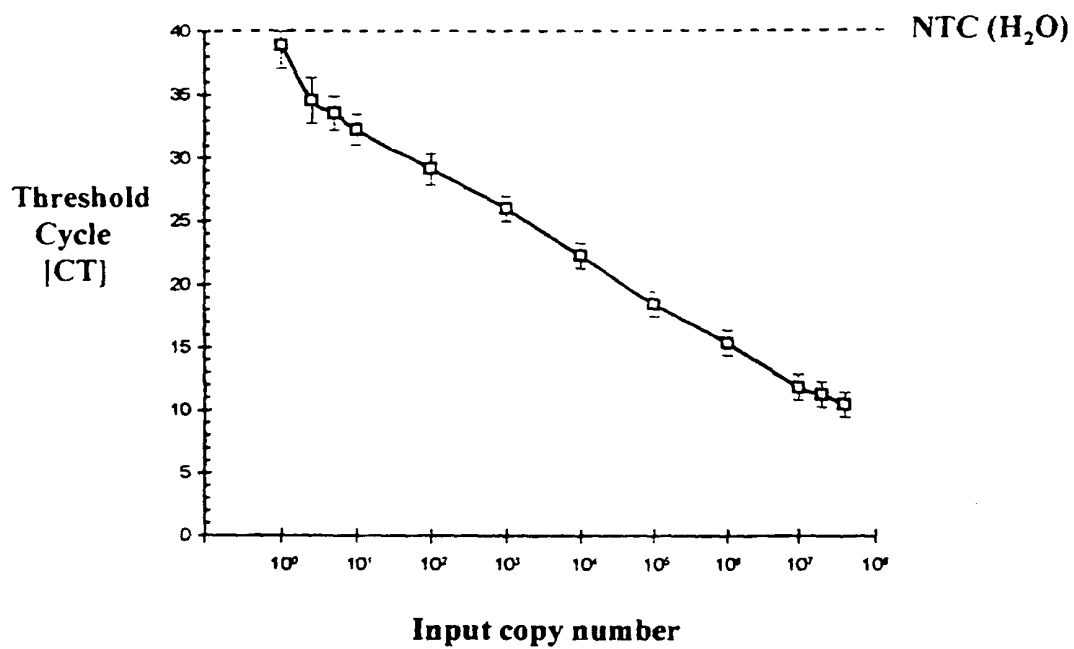
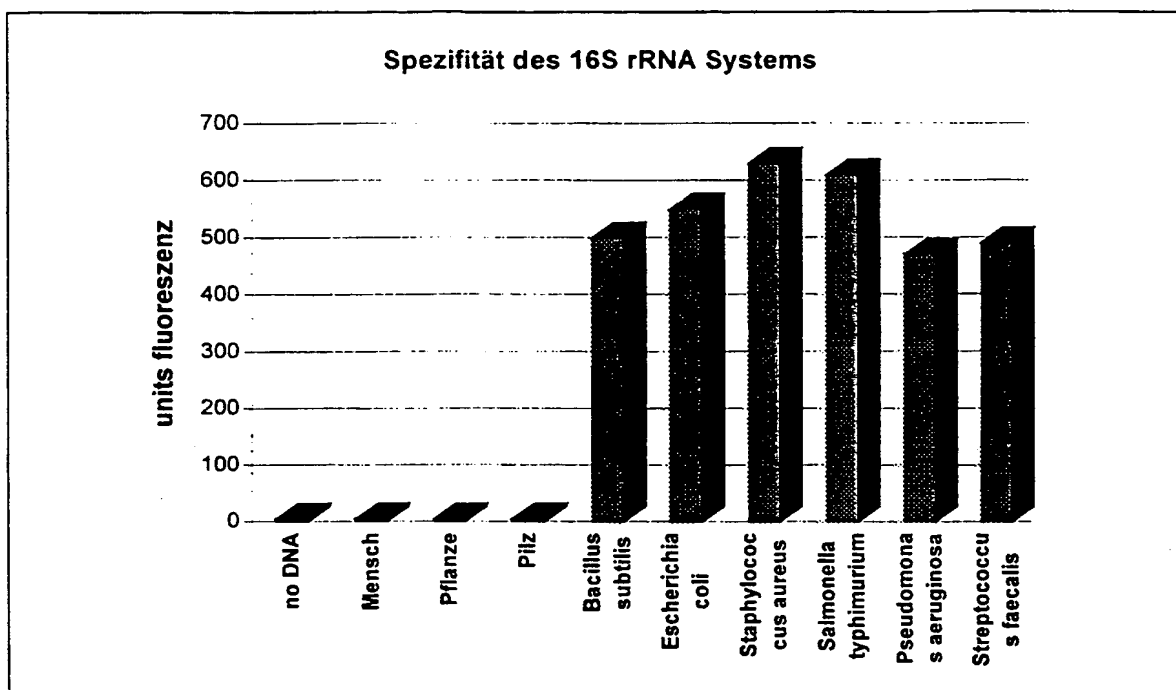


Abb. 6

5

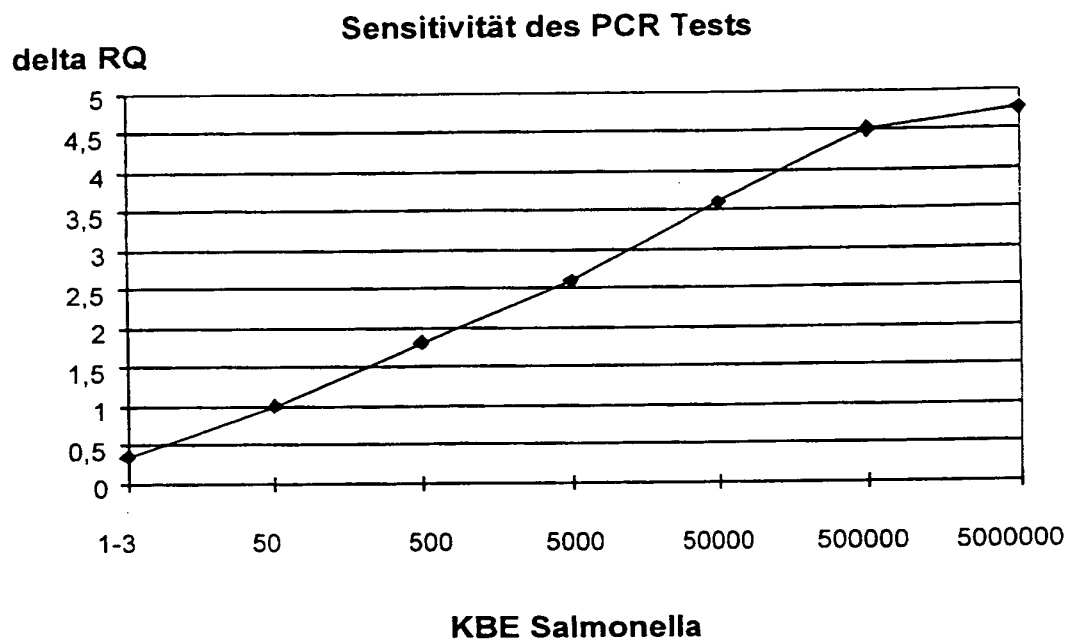
Abb. 7

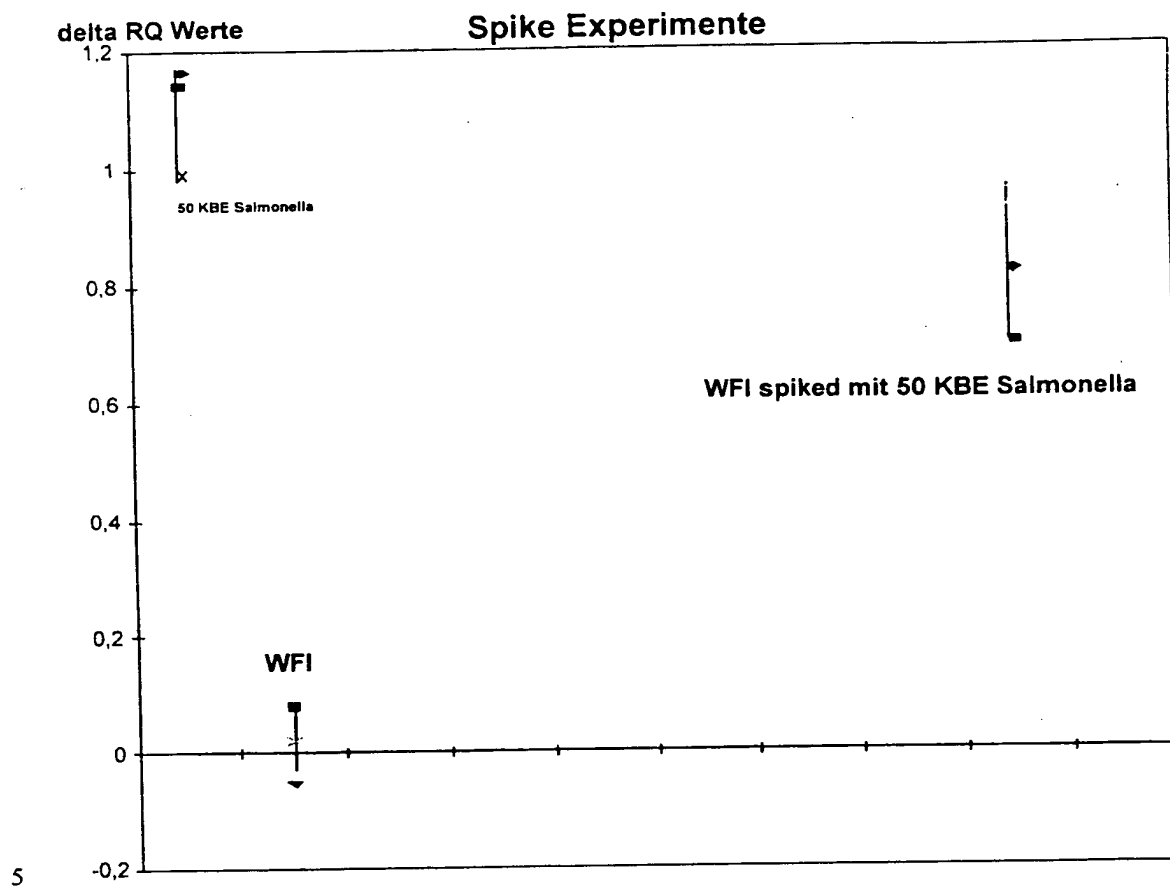
Abb. 8

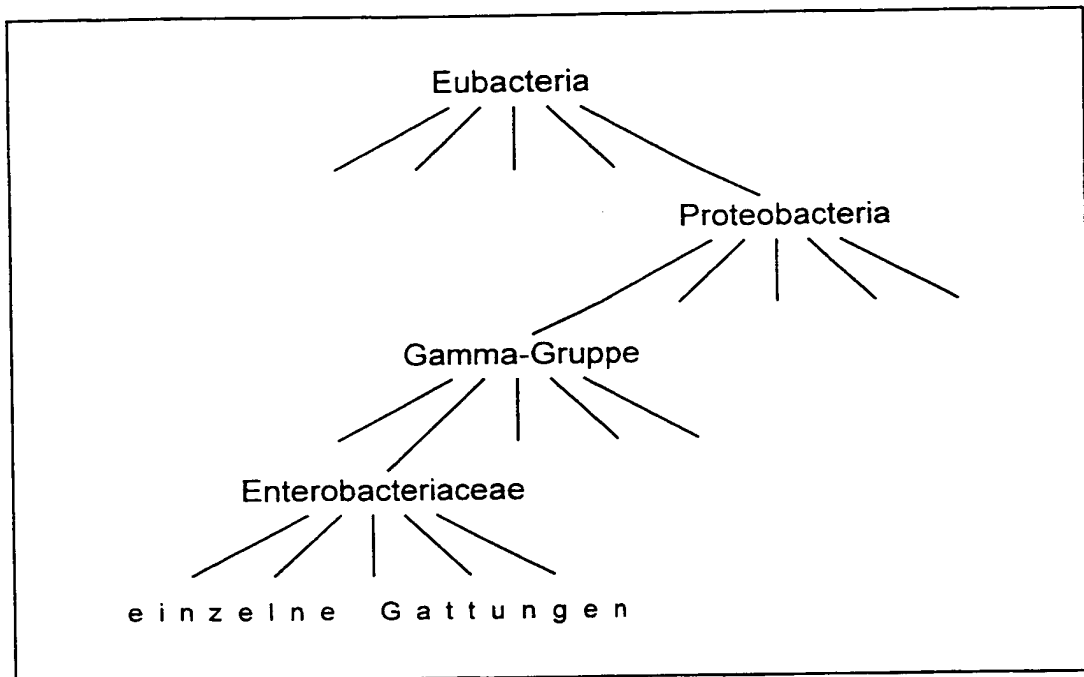
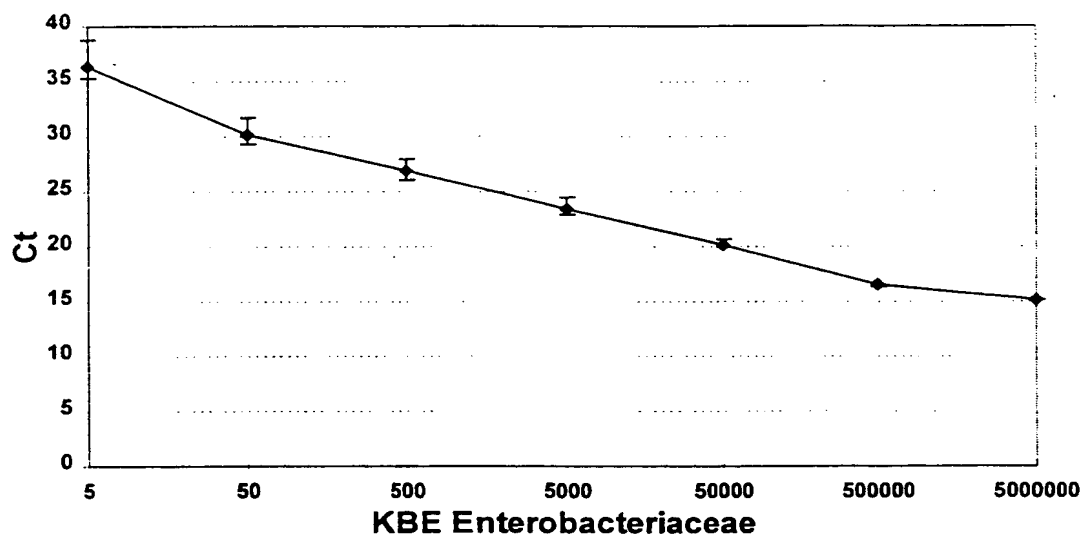
Abb. 9

Abb. 10

(1) ALLGEMEINE ANGABEN**(i) ANMELDER:****(A) NAME: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT****5 (B) STRASSE: MÜLLERSTRASSE 178****(C) ORT: 13353 BERLIN****(E) LAND: DEUTSCHLAND****(F) POSTLEITZAHL: 13353****10 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Detektion von Mikroorganismen in Produkten****(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 54 Sequenzprotokolle****(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG****(A) DATENTREÄGER: DISKETTE****(B) COMPUTER: 486/INTEL****15 (C) BETRIEBSSYSTEM: WINDOWS****(D) SOFTWARE: WINWORD;****(v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:****Für alle SEQ ID NO 1 bis 54 gilt:****20 ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz****STRANGFORM: Einzelstrangform****TOPOLOGIE: linear****HYPOTHETISCH: nein****25 ANTISENS: nein****(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:****(i) SEQUENZKENNZEICHEN****SEQUENZLÄNGE: 214 Nukleotide****ART DES MOLEKÜLS: Primer-Sonde-Primer****30 URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Staphylococcus aureus****MERKMAL: Primer-Sonde-Primer für Staphylococcus aureus****SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:****AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAGTAAGCT AATGGAAAAC 040****ACATATAGAG ACGTGAATAT TGCTTTAGCT AATGAATTAA 080****35 CAAAAATTTG CAATAACTTA AATATTAATG TATTAGTTGT 120****GATTGAAATG GCAAACAAAC ATCCGCGTGT TAATATCCAT 160****CAACCTGGTC CAGGAGTAGG CGGTCATTGT TTAGCTGTTG 200****ATCCGTACTT TATT 214****40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:****(i) SEQUENZKENNZEICHEN****SEQUENZLÄNGE: 310 Nukleotide****ART DES MOLEKÜLS: Primer-Sonde-Primer****URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Staphylococcus aureus****45 MERKMAL: Primer-Sonde-Primer für Pseudomonas aeruginosa****SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:**

- CAGGCCTTCG ATGCCCTGAG CGGTATTCAG GCACCGGCGC 040
 CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTCTGCC AATTGCTGCT 080
 GGACTATGTA TCTGCCGGAC ACTTCGAGGT CTACGAGCAA 120
 CTGACGGCGG AAGGCAAGGC CTTGCGCGAT CAGCGCGGCC 160
 5 TGGAGCTGGC CAAGCAGATC TTCCCCGGC TGGAGCCAT 200
 CACCGAATCC GCGCTGAACT TCAACGACCG CTGCGACAAC 240
 GCGGATTGCC GTGAAGGAGC CTGCCTCATC GCGGAGCTGA 280
 AGGTCCTGCG GCAACAGTTG CACGAACGCT 310
- 10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN
 SEQUENZLÄNGE: 222 Nukleotide
 ART DES MOLEKÜLS: Primer-Sonde-Primer
 URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Staphylococcus aureus
 15 MERKMAL: Primer-Sonde-Primer für Escherichia coli
 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:
 AAAGTAGAAC GTAATGGTTC TGTGCATATT GATGCCCCGCG 040
 ACGTTAATGT ATTCTGCGCA CCTTACGATC TGGTTAAAAC 080
 CATGCGTGCT TCTATCTGGG CGCTGGGGCC GCTGGTAGCG 120
 20 CGCTTTGGTC AGGGGCAAGT TTCACTACCT GCGGTTGTA 160
 CGATCGGTGC GCGTCCGGTT GATCTACACA TTTCTGGCCT 200
 CGAACAATTA GGCGCGACCA TC 222
- 25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN
 SEQUENZLÄNGE: 310 Nukleotide
 ART DES MOLEKÜLS: Primer-Sonde-Primer
 URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Salmonella ssp.
 MERKMAL: Primer-Sonde-Primer für Salmonella ssp.
 30 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:
 TGATTGAAGC CGATGCCGGT GAAATTATCG CCACGTTCCG 040
 GCAATTCGTT ATTGGCGATA GCCTGGCGGT GGGTTTGTGTT 080
 GTCTTCTCTA TTGTCACCGT GGTCCAGTTT ATCGTTATTA 120
 CCAAAGGTTT AGAACGTGTC GCGGAAGTCG CGGCCCCGATT 160
 35 TTCTCTGGAT GGTATGCCCG GTAAACAGAT GAGTATTGAT 200
 GCCGATTTGA AGGCCGGTAT TATTGATGCG GATGCCGCGC 240
 GCGAACGGCG AAGCGTACTG GAAAGGGAAA GCCAGCTTTA 280
 CGGTTTCCTTT GACGGTGCGA TGAAGTTTAT 310
- 40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN
 SEQUENZLÄNGE: 356 Nukleotide
 ART DES MOLEKÜLS: Primer-Sonde-Primer
 URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Bakterien
 45 MERKMAL: Primer-Sonde-Primer für Bakterien
 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:
 GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTTGTGAAA TGTTGGGTTA 040
 AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTATCCTT TGTTGCCAGC 080
 GGTCCGGCCG GGAAC TCAA GGAGACTGCC AGTGATAAAC 120
 50 TGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAGTCAT CATGGCCCTT 160
 ACGACCAGGG CTACACACGT GCTACAATGG CGCATACAAA 200

GAGAAGCGAC CTCGCGAGAG CAAGCGGACC TCATAAAGTG 240
 CGTCGTAGTC CGGATTGGAG TCTGCAACTC GACTCCATGA 280
 AGTCGGAATC GCTAGTAATC GTGGATCAGA ATGCCACGGT 320
 GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTCA 356

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Primer cap-8 forward # 15297*)

10 MERKMAL: Primer cap-8 forward # 15297*)

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG 024

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz

STRANGFORM: Einzelstrangform

TOPOLOGIE: linear

20 HYPOTHETISCH: nein

ANTISENS: nein

ART DES MOLEKÜLS: Sonde cap-8 # 15460*

MERKMAL: Sonde cap-8 # 15460*, als reverse complement
eingesetzt, TAMRA vor und FAM nach der Sequenz

25 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG 020

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 26 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Primer cap-8 reverse # 15485

MERKMAL: Primer cap-8 reverse # 15485* als reverse complement
eingesetzt

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

35 GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TTTATT 026

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Primer *algQ* forward # 876*MERKMAL: Primer *algQ* forward # 876*

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC 023

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 26 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Sonde *algQ* # 91150 MERKMAL: Sonde *algQ* # 911, FAM vor und TAMRA nach der
Sequenz

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC 026

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Reverse Primer Sequence (# 1147):
5 MERKMAL: Primer *algQ* reverse # 1147* als reverse complement eingesetzt
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:
CTGAAGGTCC TCGGCAACA GTT 023
- 10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Forward Primer Sequence (# 767*):
MERKMAL: Forward Primer Sequence (# 767*):
15 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:
GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG 024
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
20 SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde (# 802)
MERKMAL: Sonde (# 802), FAM vor und RAMARA nach der Sequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:
TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT 023
- 25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Reverse Primer Sequence (# 884)
30 MERKMAL: Reverse Primer Sequence (# 884) als reverse complement eingesetzt
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:
GCAAGTTTCA CTACCTGGCG GTTG 024
- 35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Forward Primer Sequence (# 269*)
MERKMAL: Forward Primer Sequence (# 269*)
40 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:
GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC 024
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
45 SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde (# 333)
MERKMAL: Sonde (# 333), FAM vor und TAMARA nach der Sequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:
CTTCTCTATT GTCACCGTGG TCCA 024
- 50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Reverse Primer Sequence (# 542)

MERKMAL: Reverse Primer Sequence (# 542) als reverse
complement eingesetzt

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG 024

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 19 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Primer 16S rRNA forward # 1053*

10 MERKMAL: Primer 16S rRNA forward # 1053*

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

GCATGGCTGT CGTCAGCTC 019

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Sonde 16S rRNA # 1090

MERKMAL: Sonde 16S rRNA # 1090, FAM vor und TAMARA nach der
Sequenz

20 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC 023

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

25 (i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Primer 16S rRNA reverse # 1386*

MERKMAL: Primer 16S rRNA reverse # 1386*

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

TGACGGGCGG TGTGTACAAG 020

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Sonde

35 MERKMAL: Sonde von Salmonella ssp

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

TTTGTTATTG GCGATAGCCT GGC 023

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

40 (i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Sonde

MERKMAL: Sonde von Salmonella ssp.

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

45 **TTCTCTGGAT GGTATGCCCG GTA 023**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 25 Nukleotide

50 ART DES MOLEKÜLS: Reverse Primer

MERKMAL: Reverse Primer für Staphylococcus aureus

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

CATTGTTTAG CTGT TGATCC GTAC T 025

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
5 MERKMAL: Forward Primer für *Staphylococcus aureus*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:
GCACGT ACTG CTGAAA TGAG TAAG 024
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:
10 (i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 21 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Forward Primer für *Pseudomonas aeruginosa*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:
15 CAGGCCTTCG ATGCCCTGAG C 021
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 22 Nukleotide
20 ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Reverse Primer für *Pseudomonas aeruginosa*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:
GCTGAAGGTC CTGCGGCAAC AG 022
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Forward Primer für *E. coli*
25 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:
30 TAGAACGTAA TGGTTCTGTG CAT 023
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
35 SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Reverse Primer für *E. coli*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:
CTGGCCTCGA ACAATTAGGC GCG 023
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
45 MERKMAL: Forward Primer für Bakterien
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:
TGCATGGCTG TCGTCAGCTC 020
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:
50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
MERKMAL: Sonde für Bakterien allgemein
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

TTGGGTTAAG TCCCG CAACG AGC 033

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

5 SEQUENZLÄNGE: 22 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Primer

MERKMAL: Forward Primer für *Staphylococcus aureus*

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

ATGCACGTAC TGCTGAAATG AG 032

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 26 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Sonde

15 MERKMAL: Sonde für *Staphylococcus aureus*

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

AACACATATA GAGACGTGAA TATTGC 035

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 22 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Primer

MERKMAL: Reverse Primer für *Staphylococcus aureus*

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

25 GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TT 022

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 25 Nukleotide

30 ART DES MOLEKÜLS: Sonde

MERKMAL: Sonde für *Pseudomonas aeruginosa*

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

CAATTGCTGC TGGACTATGT ATCTG 025

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 25 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Primer

MERKMAL: Forward Primer für *Pseudomonas aeruginosa*

40 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

CAACGCCGAA GAACTCCAGC ATTTC 025

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

45 SEQUENZLÄNGE: 27 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Sonde

MERKMAL: Sonde für *Pseudomonas aeruginosa*

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

50 AACGCCGA AG AACTCCAG CA TTTCTGC 027

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 22 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Primer

MERKMAL: Reverse Primer für *Escherichia coli*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:
CATTCTGGC CTCGAACAAT TA

022

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
MERKMAL: Sonde für *Escherichia coli*
10 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:
CCGCTGGTAG CGCGTTTTGG TCA

023

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
15 SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Forward Primer für *Escherichia coli*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:
ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG

023

20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 25 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
25 MERKMAL: Forward Primer für *Salmonella ssp*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:
TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT

025

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:
30 (i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
MERKMAL: Sonde für *Salmonella ssp*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:
35 TTTGTTGTCT TCTCTATTGT CACC

024

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide
40 ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Reverse Primer für Bakterien allgemein
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:
AAGTCGTAAC AAGGTAACCA

020

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 21 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Forward Primer für Bakterien allgemein
50 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:
GGATTAGATA CCCTGGTAGT C

021

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN

- SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Forward-Primer (#1053)
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Forward-Primer (#1053) für Enterobacteriaceae
5 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:
GCATGGCTGT CGTCAGCTC 20
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
10 SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Reverse-Primer (#1270)
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Reverse-Primer (#1270) für Enterobacteriaceae
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:
15 TTTATGAGGT CCGCTTGCTC 45
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
20 SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde (#1090)
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Sonde (#1090) für Enterobacteriaceae
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:
25 TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC 23
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 19 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: (Forward-Primer #1053)
30 URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Targetsequenz des 16S rRNA Gens von
Enterobacteriaceae
MERKMAL: (Forward-Primer #1053) für Enterobacteriaceae
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:
GCATGGCTGT CGTCAGCTC 19
35
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
40 SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: (Sonde #1090)
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: (Sonde #1090) für Enterobacteriaceae
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:
45 TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC 23
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 19 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: (Reverse-Primer #1270)
50 URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: (Reverse-Primer #1270) für Enterobacteriaceae
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:
TCGTTCCGCT GGAGTATTT 19

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide
5 ART DES MOLEKÜLS: Forward-Primer
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Forward-Primer für Enterobacteriaceae als Fehlsequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:
GTGCTGCATG GCTGTCGTC 20
- 10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 51:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
15 URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Sonde für Enterobacteriaceae als Fehlsequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 51:
AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CC 23
- 20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 52:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
25 MERKMAL: Sonde für Enterobacteriaceae als Fehlsequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 52:
ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACG 23
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 53:
30 (i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Forward-Primer
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Forward-Primer für Enterobacteriaceae als Fehlsequenz
35 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 53:
GCTGTCGTCA GCTCGTGTT 20
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 54:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
40 SEQUENZLÄNGE: 21 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Reverse-Primer
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Reverse-Primer für Enterobacteriaceae als Fehlsequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 54:
45 AACTTTATGA GGTCCGCTTG C 21

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/58713 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. November 1999 (18.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01471 (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Mai 1999 (10.05.99) (30) Prioritätsdaten: 198 22 108.8 12. Mai 1998 (12.05.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOIN-SIDE GMBH [DE/DE]; Warthestr. 21, D-14513 Teltow (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GERBLING, Klaus-Peter [DE/DE]; Peschkestrasse 3, D-12161 Berlin (DE). LAUTER, Frank-Roman [DE/DE]; Ritterstrasse 25A, D-14513 Teltow (DE). GROHMANN, Lutz [DE/DE]; Stubenrauchstrasse 21, D-12161 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 10. August 2000 (10.08.00)
(54) Title: METHOD FOR DETECTING MICROORGANISMS IN PRODUCTS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DETEKTION VON MIKROORGANISMEN IN PRODUKTEN (57) Abstract The invention relates to a detection method and a test kit for economic detection of germs in pharmaceutical and cosmetic products. The invention uses specific probes and primers whose replication is made visible by means of a special indicator system, whereby a fluorescent colorant is released. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Detektionsverfahren und ein Testkit zur schnellen, ökonomischen Detektion von Keimen in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten. Dabei werden spezifische Sonden und Primer eingesetzt, deren Replikation durch ein spezielles Indikatorsystem sichtbar gemacht wird, wobei ein Fluoreszenz-Farbstoff freigesetzt wird.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/01471

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. SAU ET AL.: "Cloning of type 8 capsule genes and analysis of gene clusters for the production of different capsular polysaccharides in Staphylococcus aureus" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 178, no. 7, April 1996 (1996-04), pages 2118-2126, XP000872772 US cited in the application	1,2
Y	abstract, discussion	3
X	WO 90 15157 A (GENE TRAK SYSTEMS) 13 December 1990 (1990-12-13) page 14, line 1 - page 16, line 16; claims -/--	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 April 2000

Date of mailing of the international search report

26.04.00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luzzatto, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/01471

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEE L G ET AL: "ALLELIC DISCRIMINATION BY NICK-TRANSLATION PCR WITH FLUOROGENIC PROBES" NUCLEIC ACIDS RESEARCH,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 21, no. 16, 11 August 1993 (1993-08-11), pages 3761-3766, XP000470188 ISSN: 0305-1048 the whole document ---	3
A	WO 91 08305 A (U-GENE RESEARCH B.V.) 13 June 1991 (1991-06-13) the whole document ---	1-3
A	WO 92 02638 A (CETUS CORP) 20 February 1992 (1992-02-20) cited in the application claims ---	1-3
A	WO 93 03186 A (HOFFMANN LA ROCHE) 18 February 1993 (1993-02-18) page 2, line 7 -page 3, line 10; claims; example 1 -----	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 99/01471

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-3 (in part) (Inventions 1 and 6)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 99/01471

The International Searching Authority found that this international application contains multiple inventions as follows:

1. Claims Nos. 1-3 (IN PART)

Method and kit for detecting *S. aureus*

2. Claims Nos. 1-3 (in part)

Method and kit for detecting *P. aeruginosa*

3. Claims Nos. 1-3 (in part)

Method and kit for detecting *E. coli*

4. Claims Nos. 1-3 (in part)

Method and kit for detecting *salmonella* ssp.

5. Claims Nos. 1-3 (in part)

Method and kit for detecting bacteria

6. Claims Nos. 1-3 (in part)

Method and kit for detecting enterobacteriaceae

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Appl. Application No

PCT/DE 99/01471

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9015157 A	A	13-12-1990	AT 127530 T	15-09-1995
			AU 5950690 A	07-01-1991
			CA 2031499 A	01-12-1990
			DE 69022180 D	12-10-1995
			DE 69022180 T	01-02-1996
			EP 0431149 A	12-06-1991
			JP 4500315 T	23-01-1992
			US 5401631 A	28-03-1995

WO 9108305 A	A	13-06-1991	NL 8902926 A	17-06-1991
			NL 9002157 A	17-06-1991
			AU 6950791 A	26-06-1991

WO 9202638 A	A	20-02-1992	US 5210015 A	11-05-1993
			AU 666837 B	29-02-1996
			AU 8651091 A	02-03-1992
			CA 2088683 A	07-02-1992
			EP 0543942 A	02-06-1993
			EP 0919565 A	02-06-1999
			JP 2825976 B	18-11-1998
			JP 6500021 T	06-01-1994
			US 5804375 A	08-09-1998
			US 5487972 A	30-01-1996

WO 9303186 A	A	18-02-1993	AT 172500 T	15-11-1998
			AU 679671 B	10-07-1997
			AU 2420292 A	02-03-1993
			CA 2116543 A	18-02-1993
			DE 69227379 D	26-11-1998
			DE 69227379 T	10-06-1999
			EP 0613502 A	07-09-1994
			ES 2125268 T	01-03-1999
			NZ 243802 A	22-12-1994
			US 5620847 A	15-04-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Jonaies Aktenzeichen

PCT/DE 99/01471

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	S. SAU ET AL.: "Cloning of type 8 capsule genes and analysis of gene clusters for the production of different capsular polysaccharides in Staphylococcus aureus" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 178, Nr. 7, April 1996 (1996-04), Seiten 2118-2126, XP000872772	1,2
Y	US in der Anmeldung erwähnt abstract, discussion	3
X	WO 90 15157 A (GENE TRAK SYSTEMS) 13. Dezember 1990 (1990-12-13) Seite 14, Zeile 1 -Seite 16, Zeile 16; Ansprüche	1-3
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. April 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26. 04. 00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Luzzatto, E

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	LEE L G ET AL: "ALLELIC DISCRIMINATION BY NICK-TRANSLATION PCR WITH FLUOROGENIC PROBES" NUCLEIC ACIDS RESEARCH,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 21, Nr. 16, 11. August 1993 (1993-08-11), Seiten 3761-3766, XP000470188 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument -----	3
A	WO 91 08305 A (U-GENE RESEARCH B.V.) 13. Juni 1991 (1991-06-13) das ganze Dokument -----	1-3
A	WO 92 02638 A (CETUS CORP) 20. Februar 1992 (1992-02-20) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche -----	1-3
A	WO 93 03186 A (HOFFMANN LA ROCHE) 18. Februar 1993 (1993-02-18) Seite 2, Zeile 7 -Seite 3, Zeile 10; Ansprüche; Beispiel 1 -----	1-3

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/01471

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht rechtfertigbar erweisen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____

2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____

3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☒ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
1-3 (teilweise) (Erfindungen 1 und 6)

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-3 (TEILWEISE)

Verfahren und Kit zum Nachweis von *S. aureus*

2. Ansprüche: 1-3 (Teilweise)

Verfahren und Kit zum Nachweis von *P. aeruginosa*

3. Ansprüche: 1-3 (Teilweise)

Verfahren und Kit zum Nachweis von *E. coli*

4. Ansprüche: 1-3 (Teilweise)

Verfahren und Kit zum Nachweis von *Salmonella* ssp.

5. Ansprüche: 1-3 (Teilweise)

Verfahren und Kit zum Nachweis von Bakterien

6. Ansprüche: 1-3 (Teilweise)

Verfahren und Kit zum Nachweis von Enterobacteriaceae

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/01471

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(r) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9015157 A	13-12-1990	AT 127530 T	15-09-1995
		AU 5950690 A	07-01-1991
		CA 2031499 A	01-12-1990
		DE 69022180 D	12-10-1995
		DE 69022180 T	01-02-1996
		EP 0431149 A	12-06-1991
		JP 4500315 T	23-01-1992
		US 5401631 A	28-03-1995
WO 9108305 A	13-06-1991	NL 8902926 A	17-06-1991
		NL 9002157 A	17-06-1991
		AU 6950791 A	26-06-1991
WO 9202638 A	20-02-1992	US 5210015 A	11-05-1993
		AU 666837 B	29-02-1996
		AU 8651091 A	02-03-1992
		CA 2088683 A	07-02-1992
		EP 0543942 A	02-06-1993
		EP 0919565 A	02-06-1999
		JP 2825976 B	18-11-1998
		JP 6500021 T	06-01-1994
		US 5804375 A	08-09-1998
		US 5487972 A	30-01-1996
WO 9303186 A	18-02-1993	AT 172500 T	15-11-1998
		AU 679671 B	10-07-1997
		AU 2420292 A	02-03-1993
		CA 2116543 A	18-02-1993
		DE 69227379 D	26-11-1998
		DE 69227379 T	10-06-1999
		EP 0613502 A	07-09-1994
		ES 2125268 T	01-03-1999
		NZ 243802 A	22-12-1994
		US 5620847 A	15-04-1997